

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002年6月13日 (13.06.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/46356 A1

(51) 国際特許分類: C12M 1/32, 1/34, G01N 33/48,
33/49, B01L 3/00, B81B 1/00, B81C 5/00

(KIKUCHI, Hiroko) [JP/JP]; 〒047-0264 北海道小樽市
桂岡町14番30 Hokkaido (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/10684

(74) 代理人: 成瀬勝夫, 外(NARUSE, Katsuo et al.); 〒
105-0003 東京都港区西新橋2丁目11番5号 セントラ
ル新橋ビル5階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2001年12月6日 (06.12.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-372467 2000年12月7日 (07.12.2000) JP
特願2001-209743 2001年7月10日 (10.07.2001) JP
特願2001-343713 2001年11月8日 (08.11.2001) JP

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特
許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式
会社 エフェクター細胞研究所 (EFFECTOR CELL
INSTITUTE) [JP/JP]; 〒153-0041 東京都目黒区駒場
4-6-2 メゾン駒場401号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

添付公開書類:

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 金ヶ崎士朗
(KANEGASAKI, Shiro) [JP/JP]; 〒214-0032 神奈川県
川崎市多摩区枳形1丁目21-2-503 Kanagawa (JP). 菊
池佑二 (KIKUCHI, Yuji) [JP/JP]; 〒301-0001 茨城県
竜ヶ崎市長保台4丁目1-10-2-506 Ibaraki (JP). 菊池裕子

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイドランスノート」を参照。

(54) Title: APPARATUS FOR TREATING SAMPLE IN MICROAMOUNT

WO 02/46356 A1

(54) 発明の名称: 微量試料処理装置

(57) Abstract: It is intended to provide a constitution for, in pouring a sample in a microamount into cells, preventing the transfer of the sample into other cells or the overflow of the sample; a constitution whereby the position of the poured sample can be controlled in the wells or the sample can be transferred into the subsequent wells under controlling; and an apparatus for detecting cell chemotaxis and separating chemotactic cells by using these constitutions. Namely, an apparatus for treating a sample in a microamount characterized in that, in case where a plural number of wells are connected to each other via members resistant to a fluid and each well is provided with tubes for pouring and sucking off the sample optionally together with a tube for relieving a pressure change in the pouring/sucking off step, these tubes have a space in common, in which a liquid can be contained, at the upper ends thereof. This apparatus is used for detecting cell chemotaxis and separating chemotactic cells.

[続葉有]



(57) 要約:

本発明は、ウェルに微量の試料を注入する際に試料が他のウェルに移動し、或いは溢れ出ること防止するための構造、及び注入された試料のウェル内における位置を調整し、或いは、次のウェルに制御しながら試料を移動させることができる構造を提供することを目的とすると共に、この構造を応用した細胞走化性検出及び走化細胞分離装置を提供することを目的とする。

即ち、本発明は、複数のウェルが流体に対して抵抗を有する部分を介して相互に連通しており、且つ夫々のウェルが試料を注入・吸出するための管及び、必要に応じ、注入・吸出時の圧力の変化を緩和するための管を備えている場合において、それ等複数の管が上端部において液体を収納できる空間を共有していることを特徴とする微量試料処理装置であり、また、細胞走化性検出及び走化細胞分離装置である。

明 細 書

微量試料処理装置

技 術 分 野

本発明は、微量の液体試料を処理するための装置に関わる。より詳しくは、反応・分析・検出等のために、液体試料を収納するための微小なウェルに試料を注入する際に、試料が溢出し、或いは、連通する他のウェルに移動することを防止すると共に、微小なウェルの内部で試料の位置を調整することができる構造を備えた微量試料処理装置に関わる。

更に、本発明は、細胞が一定方向に自力で移動するかどうかの判定、細胞が自力で移動する状態の観察、或いは自力で移動した細胞の数を計数するための装置、即ち、細胞走化性検出装置に関わる。また、本発明は、細胞が選択的に自力で移動することを利用する細胞の分離装置に関わる。より詳しくは、検出・分離等のために、細胞懸濁液又は検体試料を収納するための微小なウェルに試料を注入する際に、試料が溢出し、或いは、連通する他のウェルに移動することを防止すると共に、微小なウェルの内部で試料の位置を調整することができる構造を備えた細胞走化性検出又は走化細胞分離装置に関わる。

背 景 技 術

ナノテクノロジーの発展と展開の下で、細胞、蛋白質、

遺伝子等を数個のレベルで取扱うようになり、極微量の試料を、反応・分析或いは検出のために容器（ウェル）に注入し、処理することが必要とされるようになった。反応・分析・検出等をマイクロチップ上で一連の流れとして行わせるために、複数のウェルがパイプや溝、或いは流路で互いに連絡している場合がある。このような場合は、試料が注入時の圧力により隣のウェルに移動しないように注意する必要がある、マニュアルで行う場合は勿論、自動注入装置による場合であっても、操作に困難を伴う。更に、微小なウェルに注入された試料の位置を調整し、或いは、次のウェルに、制御しながら試料を移動させることも望まれる。

本発明は、かかる装置において、ウェルに微量の試料を注入する際に試料が他のウェルに移動し、或いは溢れ出ることをより確実に防止するための構造を提供することを目的の一つとし、更には、注入された試料のウェル内における位置を調整し、或いは、次のウェルに制御しながら試料を移動させる構造を提供することを目的とする。また、試料の注入、移動における制御が自動化された微量試料処理装置を提供することを目的とする。

更に、本発明は、上記機能を有する構造を応用した細胞走化性検出又は走化細胞分離装置を提供することを目的とする。

発 明 の 開 示

本発明は、複数のウェルが流体に対して抵抗を有する

部分を介して相互に連通しており、且つ夫々のウエルが試料を注入・吸出するための管及び、必要に応じ、注入・吸出時の圧力の変化を緩和するための管を備えている構造において、それ等複数の管が上端部において液体を収納できる空間を共有していることを特徴とする微量試料処理装置であり、流体に対して抵抗を有する部分は、1乃至複数の細いパイプ、狭い間隙、細い溝、フィルター、樹脂カラム、その他流体を通過させ得るが抵抗性を有する構造から選ぶことができる。

また、本発明は、ウエルに設けられた管の上端部が、流体に対して抵抗を有する部分を介して相対する1又は複数のウエルに設けられた管の上端部よりも高く設定されていることを特徴とする微量試料処理装置である。本発明の微量試料処理装置は、流路を介して互いに連通しているウエルの何れか一方又は双方において、流路の近傍における液体試料の量を制限するために流路に直交して壁が設けられていても良い。

本発明は、上記微量試料処理装置よりなる単位ユニットの1つ、同一又は複数種のユニットを複数個集積させてなる集積ユニット、又は複数の集積ユニットよりなるユニット部及び該ユニット部において液面を調節するためのピペットを備え、且つ、該液面調節ピペットの作動を制御する機構を備えていることを特徴とする微量試料処理装置であり、更には、液面調節ピペットが、ユニット部の各ユニットの上端部において複数の管により共有されている空間からそこに存在する液体を所定量吸引し

てウェル内における試料の位置を調整し、或いは、次のウェルに試料を移動させ、必要に応じ該空間に先に吸引した量の液体を供給し液面を元に戻すよう制御されることを特徴とする自動化された微量試料処理装置であり、必要に応じて、試料貯蔵部、検体貯蔵部及びピペット洗浄部並びにこれ等各部を移動する試料供給ピペット及び検体供給ピペット並びにこれ等ピペットの作動を制御する機構を備えることができる。ここで、ピペットの材質は、ガラスに限らず、金属、プラスチック等適宜選んで使用できる。

本発明は、流体に対して抵抗を有する流路を介して複数のウェルが互いに連通していること、各ウェルが試料を注入・採取するための管及び必要に応じ、試料の注入・採取による圧力の変化を緩和するための管を備えていること、それ等複数の管が上端部において液体を収納できる空間を共有していること、及びウェルは管が設けられている側とは反対の側においてガラス基板と密着していることを特徴とする細胞走化性検出又は走化細胞分離装置を含む。

本発明は、上記の細胞走化性検出又は細胞分離のための装置において、細胞を収納するためのウェルに設けられた管の上端部が、流体に対して抵抗を有する流路を介して相対する1又は複数のウェルに設けられた管の上端部よりも高く設定されていることを特徴とする細胞走化性検出又は走化細胞分離装置である。

更に、本発明の装置は、流体に対して抵抗を有する流

路が、ガラス基板との間で、狭い隙間を形成する土手であることが好ましく、この場合において、流路において、土手の上部にテラスが設けられており、該テラスはガラス基板との間で細胞の径又はその変形能に合わせた隙間を形成していてもよく、或いは、流路において、土手の上部に細胞の径又はその変形能に合わせた幅の溝を1乃至複数本構成する障壁が設けられており、必要に応じ、障壁と共にテラスが形成されており、該テラスもガラス基板との間で細胞の径又はその変形能に合わせた隙間を形成していてもよい。流路において、相対するウェルに向かう方向の複数本の溝は、これに直交する1乃至複数本の溝で互いに連通していることができ、更には、流路において、相対するウェルに向かう方向の複数本の溝の幅が、これに直交する1乃至複数の溝を横切る度に段階的に変化することができ、また、流路において、相対するウェルに向かう方向の複数本の溝が、これに直交する1乃至複数本の溝を横切る度に、相互の位置をシフトさせて形成されていてもよい。更には、流路において、溝を構成する障壁の列が土手の中央に設けられたテラスを挟んで2箇所形成されていてもよい。また、流路に設けられた土手に、ガラス基板との間で異なる深さの隙間を形成するべく、テラスが多段に形成されていてもよい。更には、流路を介して互いに連通しているウェルの何れか一方又は双方において、流路の近傍における液体試料の量を制限するために流路に直交して壁が設けられていてもよい。

本発明は、上記の細胞走化性検出又は走化細胞分離装置よりなる単位ユニットの1つ、同一又は複数種のユニットを複数個集積させてなる集積ユニット、又は複数の集積ユニットよりなるユニット部、細胞貯蔵部、検体貯蔵部、これ等各部を移動する液面調節ピペット、細胞供給ピペット、検体供給ピペット及びユニット部における細胞の移動を検出し、必要に応じて検出結果を記録する検出部をユニット部と一体化して設けるか、または、複数のユニット部に対応可能な様に設け、且つ、液面調節ピペット、細胞供給ピペット及び検体供給ピペットの移動を制御する機構及び、必要に応じ、ユニット部を検出部に移動させると共に次のユニット部をピペットの動線の位置に移動させるための機構を備えていることを特徴とする自動化された細胞走化性検出又は走化細胞分離装置であり、また、必要に応じ、ピペット洗浄部を備えていても良い。

更に本発明は、細胞供給ピペットが細胞貯蔵部から所定量の細胞懸濁液を、必要に応じ攪拌後、吸引して、これをユニット部に供給し、次いで、液面調節ピペットがユニット部の各ユニットにおいて複数の管の上端部により共有されている空間からそこに存在する液体を所定量吸引してウェル内の細胞の位置を調整し、次いで液面調節ピペットが該空間に先に吸引した量の液体を供給して液面を元の位置にまで戻し、次いで検体供給ピペットが検体貯蔵部から所定量の検体を吸引し、これをユニット部に供給後、必要に応じ、ピペット洗浄部に移動し、洗

浄液の吸排を反復繰り返してピペットを洗浄するよう、各ピペットの作動が制御されることを特徴とする自動化された細胞走化性検出又は走化細胞分離装置である。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明者らが先に提案した、細胞走化性検出及び細胞分離のための装置の一例を示す概念図である。

図 2 は、図 1 の装置の下面図である。

図 3 は、本発明の構造を、細胞走化性検出及び細胞分離装置に適用した場合の一例を示す概念図である。矢印は、装置を満たす液体の液面の位置を示す。

図 4 は、本発明の構造を、細胞走化性検出及び細胞分離装置に適用した場合の他の例であって、ウエルに試料を注入・採取するための管 3 と試料の注入・採取時における昇圧・減圧を回避するための管 4 が設けられている装置の構造を示す概念図である。矢印は、装置を満たす液体の液面の位置を示す。

図 5 は、本発明の構造を、細胞走化性検出及び細胞分離装置に適用した場合の他の例であって、細胞を入れるウエル 2A の管 3A の上端部 3Ab が、他のウエル 2B の管 3B の上端部 3Bb より高く設定されている構造を示す概念図である。矢印 I 及び矢印 II は、装置を満たす液体の液面の位置を示す。

図 6 は、本発明の構造を、細胞走化性検出及び細胞分離装置に適用した場合の他の例であって、ウエルに試料を注入・採取するための管 3 と試料の注入・採取時にお

ける昇圧・減圧を回避するための管 4 が設けられている装置において、細胞を入れるウエル 2A の管 3A、4A の上端部 3Ab、4Ab が他のウエル 2B の管 3B、4B の上端部 3Bb、4Bb より高く設定されている構造を示す概念図である。矢印 I 及び矢印 II は、装置を満たす液体の液面の位置を示す。

図 7 は、図 6 の構造の変形例を示す。矢印 I 及び矢印 II は、装置を満たす液体の液面の位置を示す。

図 8 は、ウエルが流路を介して 3 連式に連通する場合の基板の上面図を示す。

図 9 は、複数のウエル $2B_1 \sim 4$ が流路 1 を介して 1 つのウエル 2A に連通している場合の基板の上面図を示す。

図 10 は、図 9 の基板を備えた装置であって、図 9 の一点破線における断面図を示す。矢印 I 及び矢印 II は、装置を満たす液体の液面の位置を示す。

図 11 は、図 9 の連通様式が円形に構成された場合の上面図を示す。

図 12 は、流路 1 の構造の一例を示す。

図 13 は、流路 1 における障壁 12 と溝 13 の配列例を示す。矢印は、相対するウエルに向かう方向を示す。

図 14 は、図 13 の流路 1 の断面図を示す。

図 15 は、流路 1 を挟んで相対するウエルに向かう方向の溝 13 が、これに直交する 2 本の溝 14 で連通している場合を示す。矢印は、相対するウエルに向かう方向を示す。

図 16 は、多数ユニットの集積例であり、同一タイプ

のユニットの集積例を示す。

図 17 は、複数種のユニットを多数集積させた例を示す説明図である。

図 18 は、多数のユニットを円形に集積させた例を示す。

図 19 は、図 18 の一点破線における断面図である。

図 20 は、細胞走化性検出及び細胞分離装置の組立例を示す図であり、(1)は部品毎の斜視図、(2)は対応する断面図である。

図 21 は、反応させるウエルと目的物を収納するウエルとがカラムを介して連通している装置の概念図である。矢印 I 及び矢印 II は、装置を満たす液体の液面の位置を示す。

図 22 は、物質を分離する装置の概念図。矢印 I 及び矢印 II は、装置を満たす液体の液面の位置を示す。

図 23 は、流路 1 における土手 8 が多段式のテラス 1-1~4 を有する場合を示す。

図 24 は、流路に沿って壁が設けられたウエルの例を示す図である。

図 25 は、流路に沿って壁が設けられたウエルの他の例を示す図である。

図 26 は、図 24 のウエルが集積配置された例を示す図である。

図 27 は、本発明に関わる装置の自動制御機構の例を示す図である。

図 28 は、液面調節ピペットの動きを示す図である。

図 29 は、細胞貯蔵部における容器の例を示す図である。

図 30 は、検体貯蔵部における容器の例を示す図である。

図 31 は、検体貯蔵部における図 30 の容器の配置例を示す図である。

図 32 は、検体貯蔵部における容器の他の例を示す図である。

図 33 は、検体貯蔵部における図 32 の容器の配置例を示す図である。

図 34 は、本発明で使用されるピペットの例を示す図である。

図 35 は、試料注入・採取用管の上部にピペット先端部の導入口を設けた例を示す。

図 36 は、流路を挟んで相対するウェルに向かう方向の溝が、これに直交する 2 本の溝で連通していると共に、相対するウェルに向かう方向の溝の幅が直交する溝を横切るときに段階的に変化する場合を示す。図中矢印は相対するウェルに向かう方向を示す。図は、障壁自体の幅が変化する場合を示す。

図 37 は、図 36 の変形例で、障壁の大きさは同じであるが、その数が増減する場合を示す。図中矢印は相対するウェルに向かう方向を示す。

図 38 は、流路を挟んで相対するウェルに向かう方向の溝が、これに直交する 3 本の溝で連通していると共に、相対するウェルに向かう方向の溝が、これに直交する溝

を横切ると共に相互の位置関係を変えている場合を示す。図では、2分の1ピッチ、直行する方向にシフトしている場合を示す。図中矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。

図39は、障壁が相対するウエルに向かう方向に繋がっている場合を示す。図中矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。

図40は、土手の中央にテラスを設け、テラスをはさんで障壁の列を2箇所形成した例を示す。

〔符号の説明〕

1：流路

2：ウエル。添字のA、B、 $B_1 \sim n$ 、Cはウエルの区別を意味する。

3：試料注入・採取用管。添字のA、B、 $B_1 \sim n$ 、Cはウエルの区別を、aは管3に対応する基板5の貫通孔を、bは管3の上端部を夫々意味する。

4：試料の注入・採取時における昇圧・減圧を回避するための管。添字のA、B、 $B_1 \sim n$ 、Cはウエルの区別を、aは管4に対応する基板5の貫通孔を、bは管4の上端部を夫々意味する。

5：基板

5'：パッキング

6：ガラス基板

7：管を穿ったブロック

8：土手

9：検出器

- 1 0 : 管の上端部により共有される空間
- 1 1、1 1₋₁~₄ : テラス
- 1 2 : 流路 1 における障壁
- 1 3 : 流路を挟んで相対するウエルに向かう方向の溝
- 1 4 : 溝 1 3 に直交する溝
- 1 5 : マグネット
- 1 6 : ウエルの間に存在するカラム
- 1 7 : カバーキャップ
- 1 8 : Oーリング
- 1 9 : ガイドピン受孔
- 2 0 : ガイドピン
- 2 1 : 中間支持体
- 2 2 : 底支持体
- 2 3 : 底部基板
- 2 4 : 流路に沿って設けられた壁
- 2 5 : 細胞貯蔵容器
- 2 6 : 細胞注入部
- 2 7 : 液体導入部
- 2 8 : 検体貯蔵容器
- 2 9 : ピペット先端部の導入口
- 3 0 : ピペット洗浄部
- 3 1 : マルチチャネルシリンジ
- 3 2 : アクチュエーター
- 3 3 : 自動ピペットのニードル
- 3 4 : マニュアル操作用ピペットの先端部
- ← : 装置を満たす液体の液面の位置

← I : 上位にある管の上端部が覆われる液面の位置

← II : 上位にある管の上端部が露出する液面の位置

X — X' : 検体供給ピペットの動線

Y — Y' : 細胞供給ピペットの動線

Z — Z' : 液面調節ピペットの動線

発明を実施するための最良の形態

本発明において、液体又は懸濁液よりなる試料が注入されるウェルを備えた微量試料処理装置とは、有機・無機化学物質、タンパク質等の高分子、遺伝子、細胞等を溶液又は懸濁液の状態で取扱う装置である。本発明の構造は、取扱う試料の量に特別の制限はないが、試料の量が数ミリリットル乃至マイクロリットルのオーダー又はそれ以下の場合に、技術的効果が高いことが期待される。

本発明は、流体の通過に対して抵抗性を有する構造物を介して相互に連通している複数のウェルの夫々が試料を注入し又は吸出するための管を備えおり、必要に応じ、ウェルの夫々が試料を注入し又は吸出する際の圧力の増減を緩和させるための管を備えている場合に適用される。即ち、これらの装置は、全体として複数の管を備えていることになり、本発明は、かかる装置において、設けられている複数の管が上端部において液体を収納できる空間を共有する構造を採用することにより、試料の注入・吸出時におけるウェル内の圧力の急激な変化によって生ずる試料の不測の移動・溢出或いは、装置の水平が崩れた時の試料の不測の移動をより効果的に防止するもので

ある。

更に、複数の管が上端部において液体を収納できる空間を共有する構造を採用することにより、ウエル内において位置を調整する必要がある試料、又は次のウエルに移動させる必要がある試料を取扱う場合に、微小なウエル内での位置の調節が可能となり、また次のウエルへの移動を制御しながら行うことが可能となる。かかる調節・移動をよりの確に行うために、該試料を収納するためのウエルに設けられた管の上端が、他のウエルに設けられた管の上端よりも高く設定される。

なお、複数のウエルの間で試料の移動を可能とするために、細いパイプ、狭い間隙、細い溝、フィルター、樹脂カラム或いは流路等で相互に連絡しているのが通常である。本発明は、複数のウエルが、かかる流体の通過に対して抵抗性を有する構造物を介して相互に連通している装置に関わる。

本発明を、複数のウエルが流路を介して互いに連通している構造の装置、例えば、細胞走化性検出又は走化細胞分離装置に適用した場合について説明すれば次の通りである。但し、本発明が、細胞走化性検出又は走化細胞分離装置に限られるものではなく、種々な装置に適用可能であることは、以上述べたところから明らかであろう。

細胞走化性を検出し、或いは細胞を分離するための装置は、ウエルの一つに細胞懸濁液を、他方のウエルに検体溶液を夫々入れ、検体溶液が収容されているウエルに向かって細胞が移動するか否かを検出し、或いは、選択

的に移動した細胞を採取する装置である。例えば、細胞懸濁液を収容するウェルと検体溶液を収容するウェルとが相互に流路でつながっており、流路を細胞が通過する状態を観察し、或いは通過中又は通過した細胞数を計数する装置である。

流路が、1個ずつの細胞が通過する状況を観察乃至検出できるスケールのものであれば、流体に対して抵抗性を有する。かかる流路を備えた装置においては、試料として用いられる細胞の量が少なくても済み、希少な細胞の検査に優れると共に、定量的検討も可能となるという利点がある。しかし、装置全体が小型になるため、極微量の試料を取扱うことになり、ウェルへの注入によって生じる昇圧の影響が生じやすく、細胞が検体溶液を収容するウェルに向かって不測の移動を起こしやすい。また、注入後においてウェルが完全に水平に維持されていない場合も細胞の移動が起こる。細胞の不測の移動は、検体が走化性因子であるのか否かの判定を混乱させる原因となる。よって、細胞が自力で検体溶液を収容するウェルに向かって移動することを正確に検出するためには、試料注入時や注入後における細胞の移動を防止することが必要である。

そのための対策の一つとして、注入時の昇圧を緩和するために、夫々のウェルに、試料注入のための管以外に、それと連通する関係にある管を設ける構造を、本発明者等が提案した（特願 2001-226466 号）。その概要を図 1 及び図 2 により説明すれば次の通りである。

図 1 に示す装置においては、ウエル 2A に、管 3A を通して細胞懸濁液が注入される。ウエル 2B には検体溶液が管 3B を通して注入され、その検体が細胞走化性因子を含む場合は、細胞がウエル 2A からウエル 2B に向かって移動しようとして、流路 1 を通過する。図 1 の場合、流路 1 は、基板 5 に設けられた土手 8 と透明なガラス基板 6 との間で、細胞の大きさに相当する隙間が形成されているが、1 個の細胞が通過できる細い溝を複数本構成する障壁が形成されていても良い。流路 1 を通過する細胞の状況は、ガラス基板 6 を通して、例えば顕微鏡 9 で観察される。図 2 は基板 5 の下面図である。

図 1 及び図 2 に示す装置は、各ウエルにおいて管 3A と 4A、3B と 4B が相互に連通した構造であり、連通管を通して圧力を分散させる構造である。これに対し、本発明は、各ウエルに設けられている総ての管の上端部が液体を収容する空間を共有する構造を採用するもので、かかる構造により注入時の移動をより確実に緩和させ、或いは、移動の制御を可能とするものである(図 3、図 4 参照)。

図 3 は、本発明に関わる構造の一例を示すもので、基板 5、ブロック 7 及びガラス基板 6 から構成されるユニットを示している。図 3 において、10 で示す空間が、各ウエルに設けられた管 3A、3B の上端部 3Ab、3Bb により共有される空間であり、装置全体は、細胞走化性に影響を与えない液体、例えば緩衝液等で満たされている。その液体の量は該空間 10 の少なくとも一部を満たす量

である。この液体により、装置全体が同一の圧力下に置かれ、且つ、液体の抵抗により、注入圧及びウエルの水平が崩れた場合による試料の急激な移動が抑制される。

図 4 は、本発明に関わる構造の他の例を示すもので、各ウエルが試料注入のための管 3A、3B 以外に、それと連通する関係にある管 4A、4B を有し、それ等総ての管の上端部 3Ab、4Ab、3Bb、4Bb が空間 10 を共有するユニットの構造を示す。

なお、移動した細胞を検体収容ウエルから採取するために、該ウエルに設けられている管から吸引する際に、内部が減圧になりウエル間の試料が相互に入り混じることが起こるが、図 4 の構造の場合は、特に効果的にその影響が緩和される。

細胞の走化性を検出し、或いは分離する場合、注入された細胞は、当初、ウエル内において流路の近傍に集められることが望ましい。図 3 で示す細胞走化性検出又は走化細胞分離装置のユニットを例にとれば、管 3A を通してウエル 2A に注入された細胞は、流路 1 の近傍に存在することが望ましい。即ち、試料である細胞は、ウエル内での位置を調整することが望まれる試料の例である。この位置の調節は、流路を介して相対するウエル 2B の管 3B から適当量の液体を適当な速度で吸引することにより行うことができる。吸引する液体の量は、空間 10 の液体を除いた後の、管及びウエルの容積から求められる。吸引する液体の量及び吸引速度はコンピュータプログラムにより容易に制御することができる。

本発明は、上記構造の変形として、試料、例えば、細胞懸濁液を収納するためのウエルに設けられた管の上端部が、流路を介して相対するウエルに設けられた管の上端部よりも高く設定されている構造を有する微量試料処理装置、例えば、細胞走化性検出装置を含む(図5乃至図7参照)。図5において、管が設けられているブロック7は、ウエル2Bに設けられた管3Bの上端部3Bbの周辺で掘り下げられており、ウエル2Aの管3Aの上端部3Abが管3Bの上端部3Bbより高く形成されている。装置全体を満たす液体は、当初は、その液面が、管3Aの上端部3Abより上に来るよう、図中、矢印Iで示される位置に来るよう液量を調節する。その状態で、管3Aを通じてウエル2Aに注入された細胞は、装置全体の均一な圧力と液体の抵抗により、急激な移動が抑制され、管3A内及びウエル2A内に散在している。次に、空間10から液体を吸引除去して液面を矢印IIの位置、即ち、管3Aの上端部3Abが露出する位置まで下げ、更に、適量の液体を吸引することにより、管3A内及びウエル2A内に散在していた細胞を、ウエル2A内の流路の近傍に集めることができる。吸引する液量は、管3A及びウエル2Aの容積に基づき算出でき、通常は、該容積の3分の1乃至10分の1で目的が達せられる。なお、ウエル2Bへの検体溶液の注入も、液面を再び矢印Iの位置に戻した状態で行うことにより、注入時の急激な圧力変化が緩和される。

液面を再び矢印Iの位置にまで戻す場合に使用する液

体として、予め装置内に存在する液体（緩衝液等の水溶液）より比重が軽い液体を用いると、各ウエルの管の上部が軽い液体により蓋がされた形になり、遮断効果により、試料の無用の拡散が防止される。かかる液体としては、試料に対して不活性であり、水に不溶で、比重が 1.0 未満であれば適宜選択して使用できる。そのような液体の例として、ミネラルオイル（比重 0.84 / シグマ社製 M3516）、流動パラフィン等が挙げられる。

図 6 は、各ウエルが試料を注入するための管 3 A、3 B と共に、これと連通する関係にある管 4 A、4 B を備えている場合において、ウエル 2A の管の上端部 3Ab、4Ab がウエル 2B の管の上端部 3Bb、4Bb より高く設定されている場合を示す。図 7 は、ブロック 7 に斜面を形成させることによりウエル 2A の管の上端部を高く設定した場合を示す。これらは、一方の管の上端部を他方のそれより高く設定する場合の例示であり、同一の目的を達するために、他にも種々の変形がありうる。

上記の、一部の管の上端部を他の管の上端部よりも高く設定する構造は、次のようなウエルの連通様式においても効果を発揮する。即ち、流路を介したウエルの連通様式として、図 3 乃至図 7 に例示する如き 2 連式の他に、必要に応じて更に結合させ、連通させることもでき、例えば、図 8 に例示する 3 連式が考えられる。図 8 において、例えば、ウエル 2A に細胞を、ウエル 2C に走化性因子を入れ、ウエル 2B に検体溶液入れることにより、検体溶液が走化性因子の阻害作用を有するか否かを調べる

ことができる。多連式にすれば、その他にも、種々の目的に応用することが可能となる。

図 9 に例示するように、一つのウエルの周りに流路を介して複数のウエルを連通させた、所謂、同心状の形式をとることもできる。更には、図 9 のタイプの変形として、図 11 の如く、同心円状にすることもできる。図 11 は、3 連式を同心円状にした例であるが、2 連式でも良い。図 9 の場合、貫通孔 3 A a に管 3 A が設けられており、貫通孔 3 B₁~₄ a には管 3 B₁~₄ が、貫通孔 4 B₁~₄ a には管 4 B₁~₄ が夫々設けられる。ウエル 2 A に管 3 A を通して細胞浮遊液を入れ、ウエル 2 B₁~₄ に種々の検体を入れることにより、複数の走化性因子の検索を同時に行うことができる。更に、複数種の細胞を含む試料をウエル 2 A に入れることにより、細胞を種類別に分離することを一度に行うことができる（ソーティング）。例えば、ウエル 2 B₁~₄ に細胞の種類に対応した走化性因子を入れ、中央のウエル 2 A に複数種の細胞を含む試料、例えば、全血を入れる。試料に含まれる細胞は、夫々の細胞走化性因子が存在する各ウエル 2 B₁~₄ に向かって移動する。一定時間経過後に各ウエル 2 B₁~₄ から、管 3 B₁~₄ を通じて細胞を採取し、或いは、各ウエル 2 B₁~₄ に移動した細胞を同定する。

図 8、9、11 に示されるようなウエルの連通様式において、管 3 及び 4 はそれ等が存在するウエル 2 において互いに連通している。これ等の連通様式において、総ての管の上端部が一つの空間 10 を共有しており、細胞が

注入されるウエルの管の上端部を他のウエルの管の上端部より高く設定し、空間 10 に、細胞が注入されるウエルの管の上端部が覆われる高さになるように、液体を入れる(図 10 参照)。図 10 は、図 9 に示す装置の一点破線における断面図であり、ウエル 2A の管 3A、4A の上端部 3Ab、4Ab が、他のウエル 2B₁~₄ の管 3B₁~₄ の上端部 3B₁~₄b よりも高くなるように設定されている。矢印 I は、空間 10 を満たす液体の液面の位置が管 3A、4A の上端部 3Ab、4Ab より上にあることを示す。管 3A を通してウエル 2A に注入された細胞は、管 3A 及びウエル 2A 内に散在しているが、空間 10 の液体を吸引除去して、液面を管 3A の上端部 3Ab が露出する、矢印 II の位置まで下げた後、更に適量を吸引することにより、ウエル 2A 内において細胞をウエル 2B₁~₄ の方向に向かって移動させ、各ウエルに向かう流路 1 の近傍に集めることができる。吸引する液量は、管 3A 及びウエル 2A の容積から算出できる。かくして、ウエル 2A 内の細胞は、ウエル 2B₁~₄ に対して、位置的に同一の条件で走化性の有無を調べることが可能となる。

本発明の構造を適用することができる、他の場面として、例えば、図 21 に示す如き装置が考えられる。即ち、図 21 は、ウエル 2A で反応を行わせ、次いでカラム 16 を通して処理を行い、吸着されずに通過したものをウエル 2B から採取する装置の概念図である。この場合、カラムが流体に対し抵抗性を有する障害を形成している。液面が矢印 I の状態で、ウエル 2A に反応させる物質を

入れ、反応終了後、液面を矢印 II まで下げて、更に吸引することによりウエル 2A の反応混合物はカラム 16 に移動する。更に吸引することにより、カラムを通過した物質がウエル 2B に移動する。なお、カラムに吸着した物質が目的物である場合は、ウエル 2A を経由して溶出液をカラムに供給し、溶出物をウエル 2B に集めることができる。

上記以外にも種々の応用が可能であり、互いに連通したウエルの間における試料の移動を制御することで、物質間の相互作用を微量のレベルで調べることができる。例えば、抗原抗体反応、酵素と基質との反応、可溶性受容体とリガンド等種々の反応に用いることができる。

例えば、図 5 の装置のウエル 2A において、一定の大きさのプラスチックビーズを結合させた抗体と抗原蛋白混合物とを反応させた後、空間 10 の液面を I から II に下げ、更に液体を吸引することにより、未反応の抗原蛋白は障壁 12 の溝を通過してウエル 2B に移動する。しかし、プラスチックビーズが結合した抗体と反応した抗原蛋白は、ビーズのために障壁 12 の溝を通過することができず、未反応の抗原蛋白と分離される。かくして、ビーズの粒径と溝の幅を適当に組合わせることにより、物質を分離することができる。

更に、磁気ビーズを利用することもできる。即ち、可磁化物質（例えば、 $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ と Fe_3O_4 ）を均一に分布させた高分子ポリマーのコアを親水性ポリマーで覆った、粒子径が均一な磁気ビーズ (magnetic beads) が市販され

ており (DYNAL 社、ノルウエー／商品名 Dynabeads)、この表面に種々の抗体を結合させることにより、磁気ビーズを細胞やタンパク質に結合させることができる。磁気ビーズは強力磁石 (MPC) を近づけると磁化されて磁力に引き寄せられ、磁石を離すと磁性を失って元通り分散するという性質を有しており、それを利用して細胞やタンパク質の精製等に利用されている。例えば、Kanegasaki, S. et al, J. Biochem. 117:758-765 (1995) においては、CD19 抗体でコートされた磁気ポリスチレンビーズ (DYNAL 社) を用いて末梢血 B リンパ球を単離している。

図 22 に例示するような装置において、液面が I の状態でウェル 2A に蛋白質の混合液と磁気ビーズでラベルされた抗体 (磁気抗体ビーズ) を注入し、ウェル 2A の底部に設置したマグネット 24 で、抗体と反応した蛋白質を吸着した後、液面を II まで下げ、更に空間 10 から液体を吸引すると、マグネット 24 で吸着されない蛋白質のみがウェル 2B に移動する。かくして、抗体を適当に選ぶことにより、所望の蛋白質を分離し、或いは、不要の蛋白質を除去することができる。従来、磁性体を用いる蛋白質の分離は、カラムを用いて行われてきたが、処理容量がミリリッターのスケールであり、微量の蛋白質を処理するのには不向きであった。本発明の装置によれば、数マイクロリッター又はそれ以下のスケールでも、蛋白質の分離を行うことができる。

本発明によれば、かかる装置の全体を小型化すること

が可能であり、試料の処理を微量で行うことができ、しかも各ユニットを多数集積させて、多数検体の処理を同時に行うことが可能となる。更に、液体の吸引・注入量のプログラム制御により自動化して行うことが容易である。

即ち、装置の自動化は、上記微量試料処理装置のユニット単体、同一又は複数種のユニットを複数個集積させてなる集積ユニット、或いは複数の集積ユニットよりなるユニット部及び液面調節ピペットと液面調節ピペットの作動を制御する機構を備えることにより達成することができる。液面調節ピペットの作動は、液面調節ピペットが、ユニット部の各ユニットの上端部において複数の管により共有されている空間からそこに存在する液体を所定量吸引してウェル内における試料の位置を調整し、或いは、次のウェルに試料を移動させ、必要に応じ該空間に先に吸引した量の液体を供給し液面を元に戻すよう制御される。この制御は、コンピュータプログラムにより容易に行われる。

なお、ユニット部と共に試料貯蔵部、検体貯蔵部、及びこれ等各部を移動する試料供給ピペットと検体供給ピペットを備え、且つ、これ等ピペットの作動を制御する機構を備えることにより、試料・検体・試薬等の供給・採取も含めた装置全体を自動制御することができる。更に、必要に応じて、ピペット洗浄部及びピペット洗浄部におけるピペットの洗浄操作を制御する機構を付加することもできる。

本発明に関わる装置の構造を、細胞走化性検出装置を例にして更に具体的に説明すれば次の通りである。但し本発明は、細胞走化性検出装置に限られるものではなく、他の装置においても同様な技術的問題点を解決するために採用し得ることは上述した通りである。

1) ユニットの構造

図3に例示するように、流路1及びウエル2A、2Bは基板5上に一体的に構築され、基板5には各ウエルに通じる管3A、3Bと連絡する穴(貫通孔)3Aa、3Baが設けられる。管3A、3Bを穿ったブロック7が、各管が基板5上の各貫通孔3Aa、3Baに合致するように固着される。ブロック7の上部には管3A、3Bの上端部3Ab、3Bbにより共有される空間10が設けられる。基板5の下面には光学研磨したガラス基板6を密着させる。なお、ブロック7、基板5及びガラス基板6はO-リングやパッキング等を介して締め付けることにより圧着・固定してもよい(図20参照)。或いは、基板5とガラス基板6とが一体化した構造を形成していてもよく、更には、基板r、ガラス基板6及びブロック7とが一体化した構造を形成していてもよい。なお、ウエル2A、2Bに設けられる管は図4に示すように、試料の注入・採取のための管3A、3B等と共に圧力の変化を緩和するための管4A、4B等を備えていても良い。また、空間10は、図5、図6等 to 示すように一部が深く掘り窪められていてもよく、或いは、図7外に示すように斜めに高低差がつけられていても良い。

2) ウエル

ウエル 2 は、試料、即ち、細胞浮遊液又は走化性因子含有溶液、同阻害剤含有溶液等の検体溶液を収納するもので、容積は、特に制限は無く、必要最小限の液量を収納できればよい。例えば、深さ 0.05~0.1mm 程度、幅 1.2mm 程度、長さ 2.5mm 程度あれば充分である。なお、流路を介して互いに連通しているウエルの何れか一方、例えば細胞を収納するウエル、又は双方において、流路の近傍における液体又は細胞懸濁液の量を制限するべく、流路に直交して壁を設けることにより、ウエル内における細胞の位置を調整してもよい(図 24)。図 24 は、流路 1 を介してウエル 2 A、2 B が連通しており、夫々のウエルに、流路 1 に直交して壁 24 A 及び 24 B が設けられている場合を示す。壁 24 と流路 1 との間隔は任意に設定できるが、通常は 50~300 μ m から選ばれる。

図 2 5 は、流路に直交して壁を設けたウエルと流路の変形例を示しており、(1)はウエルの幅の一部に流路が設けられている場合を、(2)は流路が中央で二分され、流路を挟んで一個のウエル(2 A)に対し二個のウエル(2 B、2 C)が設けられていると共にウエル 2 A 側にのみ壁 24 が設けられている場合を、(3)は流路において障壁の列がテラス 11 を挟んで二列設けられている場合を、夫々示している。このような変形は例示として挙げたもので、これ等に限られないことは云うまでもない。また、必要に応じ、流路に直交して設けた壁と土手の間をテラスにしてもよい。

3) 流路

流路 1 (図 1、図 3、図 4 参照) の構造の一例を図 1 2 により説明すれば次の通りである。流路 1 は、両端のウエル 2 A とウエル 2 B を隔てる土手 8 (基板 5 上の突出部) 及びガラス基板 6 により構成される。土手 8 は、流路 1 の両端にあるウエル 2 A、2 B を隔てるもので、土手 8 のサイズは、特に限定されるものではないが、例えば、高さ 0.003~0.1 mm 程度、相対するウエルに向かう方向における長さとして 0.01~0.5 mm 程度、相対するウエルに向かう方向に直交する方向における長さとして 1.2 mm 程度あればよい。

好ましい態様としては、土手の上に、図 1 3 ~ 図 1 5 に例示されるような複数の障壁 12 が設けられ、細胞が通過する溝 13 が形成される。土手の上部に溝を構成する障壁を設けない場合は、土手の上面がガラス基板との間で細胞の径又は細胞の変形能に合わせた深さ乃至隙間であるテラスを形成する。この場合の深さは、細胞の種類に合わせて、通常 3 ~ 50 μ m から選ばれる。好中球、好酸球、好塩基球、単球・マクロファージ、T 細胞、B 細胞等の場合は 3 ~ 10 μ m、例えば 4、5、8 又は 10 μ m から選ばれ、がん細胞や組織に存在する細胞の場合は 8 ~ 20 μ m の幅が選ばれる。

土手の上面に、障壁を挟んで、平面であるテラスを設けると細胞の通過が観察しやすくなる。テラス 11 (図 1 2) は、必須なものではないが、設けることが好ましい。テラス 11 を設ける場合、その相対するウエルに向かう

方向の長さは約 0.01 mm 乃至約 0.5 mm から適宜選ばれる。

なお、図 23 に例示するように、テラス 11 を多段式に形成することにより、ウエル内で細胞等の試料の位置を調整するために、一方のウエル側から吸引すると、他方に入れた試料が土手 8 の近傍に集まり易くなる。例えば、試料が好中球、好酸球、好塩基球等である場合、テラス 11₋₂ 及び 11₋₃ のガラス基板 6 からの距離（図においては障壁 12 の高さ）を 3 μ m、テラス 11₋₁ 及び 11₋₄ のガラス基板 6 からの距離を 4.5 μ m とし、ウエル 2 A に細胞を入れ、ウエル 2 B 側から吸引すると、これらの細胞はテラス 11₋₁ で一度止まった後、テラス 11₋₂ とガラス基板 6 との間に集まり易くなる。各テラス 11₋₁ ~ 4 のガラス基板 6 からの距離は、取扱う試料に応じて適宜設定することができ、概ね 3 乃至 5 μ m の範囲で設定され得るが、これに限定されるわけではない。ここで、細胞を収納するウエルの反対側のテラス（11₋₃）の長さを、細胞を収納するウエルの側のテラス（テラス 11₋₂）より約 1.5 乃至 5 倍長くすると、溝を通り抜けた細胞の観察や計数をより容易に行うことができる。なお、図 23 は障壁 12 が設けられている場合を示しているが、テラス 11₋₂ 及び 11₋₃ のガラス基板 6 からの距離が細胞の径又は変形能に相当する場合は、障壁は必ずしも必要ではない。

土手の上面に障壁 12（図 12~14 参照）を設ける場合、障壁 12 により構成される溝 13 の断面は、V 字型断面、

凹型断面、半円型断面等、任意の形状とすることができる。溝 13 の幅は、細胞の径又はその変形能に合わせた幅であることが好ましい。ここに、細胞の変形能とは、細胞が弾力性を有するものであるとき、その弾力性のために容易に形を変え、扁平状やひも状などの形態をとり、通常、細胞が自由空間でとる形状（球状）において有する径よりも狭い間隔の溝を通り抜けることを言う。かかる溝を設けることにより、細胞を個々のレベルで観察することが可能となり、又、細胞を所望の種類ごとに分離することができる。溝 13 の幅は通常 $3 \sim 50 \mu\text{m}$ から選ばれ、対象とする細胞が 1 個ずつ通過するだけの幅であることが好ましく、細胞の種類に合わせて好適な幅が選ばれる。好中球、好酸球、好塩基球、単球・マクロファージ、T 細胞、B 細胞等の場合は $3 \sim 10 \mu\text{m}$ 、例えば 3、5、8 又は $10 \mu\text{m}$ から選ばれ、がん細胞や組織に存在する細胞の場合は $8 \sim 20 \mu\text{m}$ の幅が選ばれる。溝 5 の数は、流路の幅に対する障壁の幅と溝の幅で決定される。例えば、流路の幅 1mm 、障壁の幅 $10 \mu\text{m}$ 、溝の幅 $5 \mu\text{m}$ の場合、溝の数は最大で 66 本となる。検出・観察に適した溝 5 の数は、1 乃至約 100 本、好ましくは好ましくは約 10 乃至約 70 本である。

障壁 12 の長さは、約 $5 \sim 400 \mu\text{m}$ から選ばれ、例えば、5、15、20、30、40、60、100、200、300 又は $400 \mu\text{m}$ のものが用いられる。障壁 12 自体の幅は適宜選ぶことができる。また、後述する図 38 の場合は、縦横の長さがほぼ等しい方が効果的である。

流路 1 を形成する溝 13 は、図 15 に例示するごとく、相対するウェルに向かう方向に直交する 1 乃至複数本の溝 14 で互いに連通していてもよい。かくすることにより、一方のウェルに入れた物質が他方のウェルに向かって拡散するのを均一化させ、或いは、細胞が通過する様子をより正確に把握することができる。その場合、溝 13 の幅を、相対するウェルに向かう方向でこれに直交する溝 14 を横切る度に段階的に変化させてもよい(図 36、図 37 参照)。或いは、流路を挟んで相対するウェルに向かう方向の溝が、これに直交する溝を横切るごとに相互の位置関係を変えてもよい(図 38 参照)。図 38 では、2 分の 1 ピッチ、直行する方向にシフトしている場合を示す。更には、障壁が相対するウェルに向かう方向に繋がっていてもよい(図 39 参照)。また、土手の中央にテラスを設け、テラスをはさんで障壁の列を 2 箇所形成することもでき(図 25(3)、図 40 参照)、かかる構造とすることにより、溝を通過した後の細胞の観察・計数が容易に行われる。なお、中央のテラスの大きさは、顕微鏡の視野でカバーできる大きさであることが望ましい。図 40 において、(1)は上面図、(2)は断面図である。

障壁 12 の高さ(溝の深さ)は、細胞の移動を観察する際の顕微鏡や CCD カメラ等の対物レンズの焦点深度内に収まる深さであると便利であり、例えば、10~40 倍の対物レンズの焦点深度に合わせると 3~4.5 μm 程度が好ましいが、これに限定される必要はない。

4) ウェルと流路の作製

基板 5 の材質としては、微細加工が容易で、細胞に対し比較的不活性なシリコン単結晶が好ましい。流路 1 の障壁 12 及び溝 13 は、このシリコン単結晶に集積回路の製作で使用するフォトリソグラフィやエッチング、例えばウェットエッチングやドライエッチング等により工作される。ウエル 2 及び貫通孔 3 a、4 a は障壁 12 や溝 13 に比べれば比較的大きいので様々な既知の工作技術を適用して作製することができる。例えば、サンドトラスト法やドライエッチング法を適用することができる。シリコン単結晶以外にも、硬質ガラス、硬質プラスチック、金属等も流路における微細な構造が構築可能であれば使用できる。プラスチックを使用する場合は、表面に親水性を付与するための処理、例えば、表面に親水性薄膜を形成させる処理を行うことが好ましい。なお、流路 1 とウエル 2 を夫々別に作製し、組合わせてもよい。

5) ブロック及び管

ブロック 7 は図 3 に例示するように、基板 5 上にあってウエルに通じる管を有する部分である。管の断面は、通常は四角形又は円形から選ばれる。管の太さは、特に限定されるものではないが、四角形の場合は 1 辺が 1 mm 程度でよく、円形の場合は直径が 1 mm 程度でよい。長さは、細胞浮遊液、検体溶液の容量を保持する上から、2 mm ～ 10 mm 程度は必要である。ブロック又は管を構成する材質は、ガラス、アクリル等のプラスチック又は金属から選ぶことができ、管は、通常の工作手段、例えば、ドリルやレーザー光線による鑿孔その他により

容易に作製される。ブロック 7 に、管の上端部により共有される空間を設けることも通常の工作技術により行うことができる。

各ユニットに手作業(マニュアル)で、細胞又は検体を注入する場合のために、夫々の注入管の上端部の周りを、注入管の径よりも大きくロート状に掘り窪めておくと、ピペットの挿入が容易となる(図 3 5 (1)、(2)における 29)。

6) ガラス基板

ガラス基板 6 は、図 3 に例示するように、基板 5 に圧着して液体を収納する空間を構成し、且つ流路を通過する細胞の観察を可能とするもので、光学的に透明且つ平面性を保持し、細胞が接着する面を提供するものである。かかる目的に適うものであれば、ガラス以外にも、透明アクリル等のプラスチックも使用できる。厚さは、基板に圧着させる際にゆがみが生じない限り特に限定されるものではないが、0.7~2 mm あれば充分である。

7) 多数のユニットの配列

流路を介して連通した複数のウェルを 1 ユニットとして、複数のユニットを 1 枚の基板上に配置乃至集積して多数検体を同時に処理する装置とすることができる。同じタイプのユニットを並列に配置し、又は、異種のユニットを配列することが可能である。以下に各図に基づいて配置乃至集積の様式を説明するが、もとよりこれ等は例示であり、これ等に限定されるものではなく、目的に応じて種々の組み合わせを採ることができる。

図 1 6 は、図 4 に示す、2 つのウエルが流路を介して連通してなるユニットが、1 辺が 16mm の正方形である一枚の基板 5 上に 12 個設けられた例を示す。この例では、1 ユニットの大きさは長辺が 5.7mm、短辺が 1.2mm であり、各ユニットは 0.8mm の間隔で配置されている。

図 1 7 は、図 1 6 に示される多数ユニットの集積を更に集積させた場合の一例を示す。即ち、図 1 7 において $A_1 \sim 4$ 、 $B_1 \sim 4$ 、 $C_1 \sim 4$ で表される四辺形の夫々が図 1 6 で示される集積である。ここで、A 行、B 行及び C 行は互いに異なったタイプのユニットの集積であることができる。

図 1 8 は、2 連式の独立したユニットが円形に集積されている例を示す。図 1 8 の一点破線における断面を図 1 9 に示す。大きさの一例を示せば、ウエル 2 A 及び 2 B は半径方向の幅が 1.5mm、流路 1 の半径方向の幅は 0.5mm であり、流路 1 には 10 μ m 幅の溝 13 が設けられている。この場合、ユニット全体としての円の半径は 5.0mm となる。

図 2 6 は、図 2 4 に示すタイプのユニットが 12 個集積配置された場合を示す。

これら、多数のユニットを集積させる場合において、ブロック 7 やガラス基板 6 は、ユニット全体をカバーするように 1 個又は 1 枚とすることができる(図 20 参照)。

図 2 0 は、多数ユニットを集積させた細胞走化性検出及び細胞分離装置を組立てる場合の一例を示す。カバー

キャップ 17 と中間支持体 21 の間に多数ユニットを集積させた基板 5、パッキング 5' とそれをカバーする 1 個のブロック 7 をおき、中間支持体 21 と底支持体 22 の間に 1 枚のガラス基板 6 をおき、ネジで締め付ける。ブロック 7 と基板 5 との位置関係は中間支持体 21 で規定され、中間支持体 21 に設けられたガイドピン 20 とブロック 7 の底面に設けられたガイドピン受孔 19 によって固定される。なお、基板 5 とブロック 7 とは直接圧着させても良い。

なお、図 20 において、集積ユニットの代わりに、1 つのユニット、即ち、1 対のウエルと流路を設けた基板 5 を用い、全体を組み立てたユニットを、一定の間隔で複数個配置することも可能である。この場合、ユニット毎に逐次交換することができる。

8.) 自動制御機構

本発明の微量試料処理装置の自動制御機構を、細胞走化性検出装置を例にして具体的に説明すれば次の通りである。なお、これは例示であり、自動化という目的を達成するために、種々の態様を採用し得ることは言うまでもない。

本発明に関わる細胞走化性検出装置の自動制御機構の例を図 27 に示す。図 27 において、U はユニット部、C は細胞貯蔵部、S は検体貯蔵部、W はピペット洗浄部を示す。直線 X-X' は、横列に配置された複数個 (図では 6 個) の検体供給ピペットの動線の例を示し、直線 Y-Y' は、横列に配置された複数個の細胞供給ピペット

の動線の例を示す。ユニット部 U はピペットの動線位置にセットされており、各ユニットの上端部の空間には液体が満たされている。細胞貯蔵部 C には、細胞が収納されており、検体貯蔵部 S には各種の検体が収納されている。横列に配置された複数個の液面調節ピペットはユニット部 U の 4 B ~ 4 A 上にセットされており、その動線は、例えば図 28 の Z - Z' で示される。各ピペットの動きの一例を説明すれば以下の如きであるが、これに限られないことは云うまでもない。

細胞供給ピペットが細胞貯蔵部 C から所定量の細胞懸濁液を吸引し、動線 Y - Y' 上をユニット部 U まで移動し、各ユニットのウェル 2 A に細胞注入管 3 A を通して細胞懸濁液を供給する。その後、細胞供給ピペットは C の位置に戻り、作動を停止するか、後続のユニットに細胞懸濁液を供給するために移動する。なお、細胞は重力下で沈殿するので、細胞供給ピペットの排出吸入動作を利用し、細胞を吸引採取する直前に、細胞貯蔵容器 25 内の細胞懸濁液を攪拌することが好ましい。

次いで、図 28 に示す如く、液面調節ピペットが各ユニットの空間部 10 の液体を吸引し、液面を II の位置まで下げた後、更に所定量を吸引してウェル 2 A 内の細胞の位置を調整する。その後、液面調節ピペットは液面 I の位置又はそれより高い位置まで上昇後、動線 Z - Z' 上の何れかの位置で先に吸引した量の液体を排出し、空間 10 の液面を I の位置に戻す。その後、液面調節ピペットは更に上昇し、作動を停止するか、後続のユニッ

ト上に移動する。

次に、検体供給ピペットが検体貯蔵部 S から所定量の検体を吸引し、動線 X - X' 上をユニット部 U まで移動し、検体注入管 3 B を通してウエル 2 B に検体を供給する。その後、検体供給ピペットは動線 X - X' 上をピペット洗浄部 W まで移動し、洗浄槽の洗浄液を反復吸排してピペットを洗浄する。その後、ピペットは洗浄槽の液面上まで上昇し、作動を停止するか、後続のユニット部 U に検体を供給するために移動する。

かくして細胞懸濁液及び検体が供給されたユニット部 U は図 27 の矢印 \Rightarrow の方向に移動し、流路 1 が検出部に合致する位置で停止し、細胞の状態が検出・記録される。ユニット部 U の移動により、次のユニット部 U の列がピペットの動線位置にまで移動し、上記の一連の作動が繰り返される。なお、ユニット部 U を検体貯蔵部 S と一緒に移動させることもでき、その場合は、ユニット部 U 及び検体貯蔵部 S の移動により、次のユニット部 U 及び検体貯蔵部 S の列がピペットの動線位置にまで移動することになる。

細胞貯蔵部 C は、ユニット部 U に供給される細胞を一時的に收容するための容器を備えており、その機能を有すれば、容器は如何なる形状でも良い。図 29 は、細胞貯蔵部 C の形体の一例を示すもので、ユニット部 U における各ユニットの配置及び複数の細胞供給ピペットに対応して複数の細胞貯蔵容器 25 が配置されている。図 29 には、各容器への細胞の注入を容易にし、細胞を無駄な

く使用するために注入部 26 が斜面の形で設けられている場合が示されている。更に、各容器には細胞懸濁液が無駄なく、且つ、容器内に入り易くするための導入部 27 を設けることが好ましい。このような構造を採用することにより、細胞懸濁液を細胞貯蔵部の任意の箇所へ注入すれば、総ての容器に細胞懸濁液が供給されるため、夫々の容器に注入する手間を省くことができる。なお、細胞懸濁液が無駄なくピペットに吸引されるために、細胞貯蔵容器 25 の底部を絞ることが好ましい。図 29 において、(1) は斜視図、(2) は上面図、(3) は図 (2) の破線 A-A' における断面図であり、(4) は図 (2) の破線 B-B' における断面図である。

検体貯蔵部 S は、ユニット部 U に供給される検体を一時的に収容するための容器を備えており、その機能を有すれば、容器は如何なる形状でも良い。多種類の検体がユニット部 U に供給される場合は、各検体をマイクロピペット等を用いた手作業により検体貯蔵部 S の容器に注入することが多いが、その場合、手作業による注入を容易にするために、図 30 に例示するように、容器の口径よりも大きな径を有するピペット先端部の導入口 29 を設けることが好ましい。また、容器から検体試料を取り出した際、残留する量を少なくするために、図 30 に例示するように、容器の底部を細く絞ることが望ましい。図 30 において、(1) は斜視図、(2) は断面図、(3) は上面図である。なお、図 30 (2) には、マニュアル操作により検体を注入する際に、ピペットの先

端部 34 がピペット先端部の導入口 29 から容器 28 の内部にまで挿入されている状態を示してある。図 3 1 には、複数の検体貯蔵容器が、検体供給ピペットの動線 X - X' に沿って配列された場合を示す。図の如く、注入口が交互に反対側になる様に配置すれば、容器の間隔をユニット部 U におけるユニットの間隔に合わせることができる。なお、検体貯蔵容器は角型であってもよく、その例を図 3 2 に示し、図 3 3 には複数の検体貯蔵容器が、検体供給ピペットの動線 X - X' に沿って配列された場合を示す。

本発明の装置において使用されるピペットは、その移動及び液体の吸引・排出をコンピューターで制御できるもので、図 3 4 に例示するような、マルチチャネルシリンジを有するタイプのものが好ましい。ピペットのニードル(先端部)は、ガラス、金属、プラスチック等から作られる。図 3 4 において (1) は上面図、(2) は横断面図である。

本発明において用いられる検出手段は、流路を移動する細胞又は移動した後の細胞を検出できる手段であればよく、必要に応じ検出結果を記録するための手段を含む。細胞を検出・記録するために知られている手段であれば何れも使用可能であり、例えば、顕微鏡、顕微鏡とビデオカメラの組合せ等である。対物レンズに CCD カメラを取り付けた構造を採用することもできる。集積ユニットの検出においては、対物レンズが各ユニットの流路を順次スキャンする構造を採用することが好ましい。

検出手段は、通常は、図 4 に示すように、ユニットの流路に設定されるが、多数ユニットを集積させた自動装置においては、所定の位置に設置された検出部に各ユニットの列が順次移動し、検出・記録を行う構造を採ることもできる。検出は、直線上に並んでいる各ユニットの流路を検出器がスキャンすることにより行われる。スキャンする検出器は 1 個でも良いし、複数個でもよい。かくすることにより、比較的少ない数の検出装置で多数の集積ユニットに対応することが可能となる。

流路上を通過する細胞の検出・計数は、細胞を直接顕微鏡で捉えることにより行うこともできるが、常法に従い、予め細胞を発光・蛍光物質でマーキングしておき、その発光・蛍光を捕捉することにより容易に検出・計数することができる。

産業上の利用可能性

本発明の構造によれば、ウェルに液体試料を注入する際に試料が他のウェルに移動し、或いは溢れ出ることを防止することができ、また、注入された試料のウェル内における位置を調整し、或いは、次のウェルに試料を制御しながら移動させることができる。

本発明の構造は、溶液や懸濁液等の、微量の試料を取扱う場合に適用する場合、或いは、細胞や粒子を大きさにより分離する場合に、特に技術的効果が高いものであり、広く応用が可能である。

本発明の構造を、細胞走化性検出装置又は細胞の走化

性を利用する細胞分離装置に応用するとき、高い技術的効果が得られる。即ち、細胞や検体溶液等の試料を注入・吸引する際の圧力変化による試料の不測の移動を抑制することができ、更には、装置の水平が崩れた時でも試料の不測の移動を抑制し、細胞の自力による運動を正確に捉え、或いは、所望の細胞を取出することができる。即ち、走化性因子又は阻害剤の作用と細胞の性質を忠実に反映させた結果を得ることができる。

本発明に関わる細胞走化性検出装置又は細胞の走化性を利用する細胞分離装置の構造において、ウェルとウェルの間に存在する流路に土手を設けること、或いは土手に所定の溝を構成する障壁を設けること又は土手の上面に形成された平面がガラス基板との間で所定の隙間を形成することにより、一方のウェル細胞懸濁液を入れ、他方のウェルの側から適量の液体を吸引するとき、細胞が流路の近傍に集まり、細胞の進行方向に向かって並ぶという状態が容易に作り出される。その結果、細胞の走化性有無がより正確に検出できる。

本発明の構造によれば、装置の小型化を図ることができ、細胞走化性検出又は走化細胞分離装置に適用すれば、使用する細胞の量を、従来使用されてきたボイデンチャンバーに比べ、50分の1乃至1000分の1とすることが可能である。即ち、本発明の装置においては、試料として全血のような生体試料そのものを用いることができ、かくして全血を試料としたとき、好中球の走化性を検出する場合は $0.1\mu\text{l}$ の血液でよく、好酸球、単球又

は好塩基球では1 μ l程度の血液で測定可能である。

本発明の構造によれば、液体の注入に際し、微妙な調整を要しないところから装置の自動化が容易に行えるというメリットがある。

本発明に関わる装置の単位ユニットは微小なものとしてすることができるため、多数のユニットを集積させることが容易であり、多数検体の同時処理が可能な装置を組み立てることができる。また、その場合、液体の注入及び検出が自動化された装置とすることが容易である。

多数のユニットを集積させるに当たり、異なったタイプのユニットを組み合わせて集積させることにより、目的を異にする検出・分離を同時に行うことができ、処理の効率を上げることが可能となる。例えば、細胞走化性検出装置の場合、同一種の細胞に対して種々の走化性因子またはその阻害剤の検索を行うとき、或いは、同一の走化性因子について異なる細胞の走化性を調べるとき等においてその検索を一度に行うことが可能となる。

請 求 の 範 囲

(1) 複数のウエルが流体に対して抵抗を有する部分を介して相互に連通しており、且つ夫々のウエルが試料を注入・吸出するための管及び、必要に応じ、注入・吸出時の圧力の変化を緩和するための管を備えている構造において、それ等複数の管が上端部において液体を収納できる空間を共有していることを特徴とする微量試料処理装置。

(2) 流体に対して抵抗を有する部分が、1乃至複数の細いパイプ、狭い間隙、細い溝、フィルター、樹脂カラム、その他流体を通過させ得るが抵抗性を有する構造である請求項1記載の微量試料処理装置。

(3) ウエルに設けられた管の上端部が、流体に対して抵抗を有する部分を介して相対する1又は複数のウエルに設けられた管の上端部よりも高く設定されていることを特徴とする請求項1記載の微量試料処理装置。

(4) 流路を介して互いに連通しているウエルの何れか一方又は双方において、流路の近傍における液体の量を制限するために、流路に直交して壁を設けることを特徴とする請求項1記載の微量試料処理装置。

(5) 請求項1乃至4記載の微量試料処理装置よりなる単位ユニットの1つ、同一又は複数種のユニットを複数個集積させてなる集積ユニット、又は複数の集積ユニットよりなるユニット部及び該ユニット部において液面を調節するためのピペットを備え、且つ、該液面調節ピ

ペットの作動を制御する機構を備えていることを特徴とする微量試料処理装置。

(6) 液面調節ピペットが、ユニット部の各ユニットの上端部において複数の管により共有されている空間からそこに存在する液体を所定量吸引してウエル内における試料の位置を調整し、或いは、次のウエルに試料を移動させ、必要に応じ該空間に先に吸引した量の液体を供給し液面を元に戻すよう制御されることを特徴とする請求項 5 記載の微量試料処理装置。

(7) 試料貯蔵部、検体貯蔵部、及びこれ等各部を移動する試料供給ピペットと検体供給ピペットを備え、且つ、試料供給ピペットと検体供給ピペットの作動を制御する機構を備えることを特徴とする請求項 5 記載の微量試料処理装置。

(8) ピペット洗浄部を備え、ピペットがピペット洗浄部において洗浄液を吸引・排出するよう制御されることを特徴とする請求項 7 記載の微量試料処理装置。

(9) 流体に対して抵抗を有する流路を介して複数のウエルが互いに連通していること、各ウエルが試料を注入・採取するための管及び必要に応じ、試料の注入・採取による圧力の変化を緩和するための管を備えていること、それ等複数の管が上端部において液体を収納できる空間を共有していること、及びウエルは管が設けられている側とは反対の側においてガラス基板と密着していることを特徴とする細胞走化性検出又は走化細胞分離装置。

(10) 細胞を収納するためのウエルに設けられた管の

上端部が、流体に対して抵抗を有する流路を介して相対する 1 又は複数のウェルに設けられた管の上端部よりも高く設定されていることを特徴とする請求項 9 記載の細胞走化性検出又は走化細胞分離装置。

(11) 流体に対して抵抗を有する流路が、ガラス基板との間で、狭い隙間を形成する土手であることを特徴とする請求項 9 記載の細胞走化性検出又は走化細胞分離装置。

(12) 流路において、土手の上部にテラスが設けられており、該テラスはガラス基板との間で細胞の径又はその変形能に合わせた隙間を形成することを特徴とする請求項 11 記載の細胞走化性検出又は走化細胞分離装置。

(13) 流路において、土手の上部に細胞の径又はその変形能に合わせた幅の溝を 1 乃至複数本構成する障壁が設けられており、必要に応じ、障壁と共にテラスが形成されており、該テラスもガラス基板との間で細胞の径又はその変形能に合わせた隙間を形成することを特徴とする請求 11 記載の細胞走化性検出又は走化細胞分離装置。

(14) 流路において、相対するウェルに向かう方向の複数本の溝が、これに直交する 1 乃至複数本の溝で互いに連通していることを特徴とする請求項 13 記載の細胞走化性検出又は走化細胞分離装置。

(15) 流路において、相対するウェルに向かう方向の複数本の溝の幅が、これに直交する 1 乃至複数の溝を横切る度に段階的に変化することを特徴とする請求項 14 記載の細胞走化性検出又は走化細胞分離装置。

(16) 流路において、相対するウェルに向かう方向の複数本の溝が、これに直交する1乃至複数本の溝を横切る度に、相互の位置をシフトさせて形成されていることを特徴とする請求項14記載の細胞走化性検出及び走化細胞分離装置。

(17) 流路において、溝を構成する障壁の列が土手の中央に設けられたテラスを挟んで2箇所形成されていることを特徴とする請求項13記載の細胞走化性検出及び走化細胞分離装置。

(18) 流路に設けられた土手に、ガラス基板との間で異なる深さの隙間を形成するべく、テラスが多段に形成されていることを特徴とする請求項12記載の細胞走化性検出又は走化細胞分離装置。

(19) 流路において、土手に細胞の径又はその変形能に合わせた幅の溝を1乃至複数本構成する障壁が設けられており、且つ、土手にテラスが多段に形成されていることを特徴とする請求項18記載の細胞走化性検出又は走化細胞分離装置。

(20) 流路を介して互いに連通しているウェルの何れか一方又は双方において、流路の近傍における液体の量を制限するために、流路に直交して壁を設けることを特徴とする請求項9記載の細胞走化性検出及び細胞分離装置。

(21) 請求項9乃至20記載の細胞走化性検出又は走化細胞分離装置よりなる単位ユニットの1つ、同一又は複数種のユニットを複数個集積させてなる集積ユニット、

又は複数の集積ユニットよりなるユニット部、細胞貯蔵部、検体貯蔵部、これ等各部を移動する液面調節ピペット、細胞供給ピペット、検体供給ピペットを備え、且つ、ユニット部における細胞の移動を検出し、必要に応じて検出結果を記録する検出部をユニット部と一体化して設けるか、または、複数のユニット部に対応可能な様に設け、液面調節ピペット、細胞供給ピペット及び検体供給ピペットの移動を制御する機構及び、必要に応じ、ユニット部を検出部に移動させると共に次のユニット部をピペットの動線の位置に移動させるための機構を備えていることを特徴とする自動化された細胞走化性検出又は走化細胞分離装置。

(22) ピペット洗浄部を備え、ピペットがピペット洗浄部において洗浄液を吸引・排出するよう制御されることを特徴とする請求項 21 記載の細胞走化性検出又は走化細胞分離装置。

(23) 細胞供給ピペットが細胞貯蔵部から所定量の細胞懸濁液を、必要に応じ攪拌後、吸引して、これをユニット部に供給し、次いで、液面調節ピペットがユニット部の各ユニットにおいて複数の管により共有されている空間からそこに存在する液体を所定量吸引してウェル内の細胞の位置を調整し、次いで液面調節ピペットが該空間に先に吸引した量の液体を供給して液面を元の位置にまで戻し、次いで検体供給ピペットが検体貯蔵部から所定量の検体を吸引し、これをユニット部に供給後、ピペット洗浄部に移動し、洗浄液の吸排を反復繰り返して

ピペットを洗浄するよう、各ピペットの作動が制御されることを特徴とする請求項 22 記載の自動化された細胞走化性検出又は走化細胞分離装置。

Fig.1

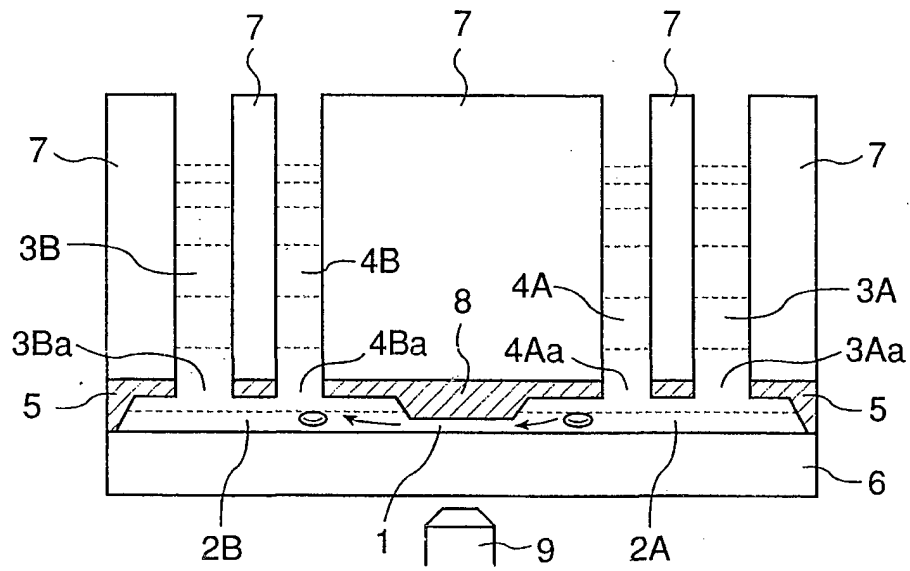
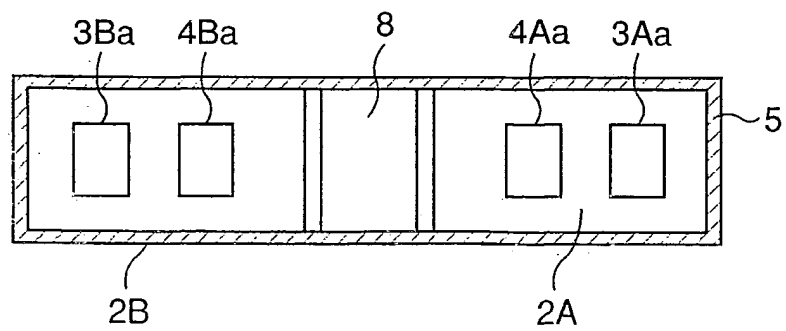
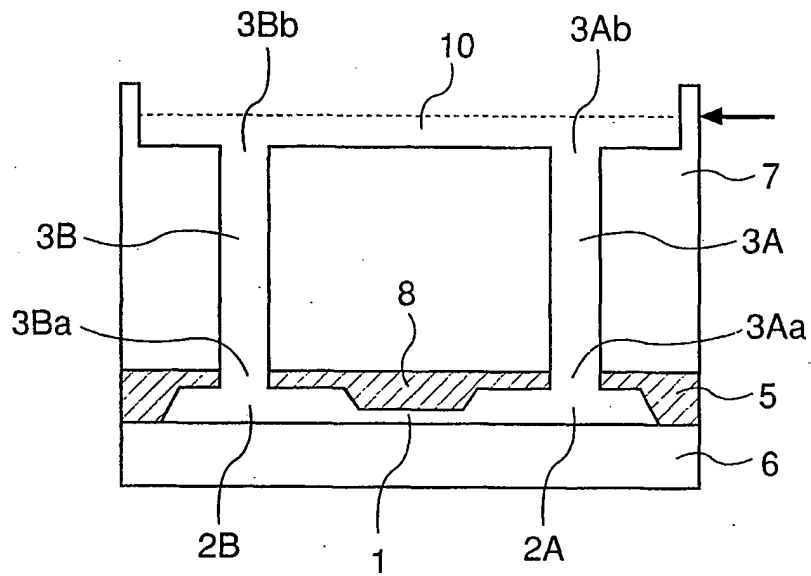


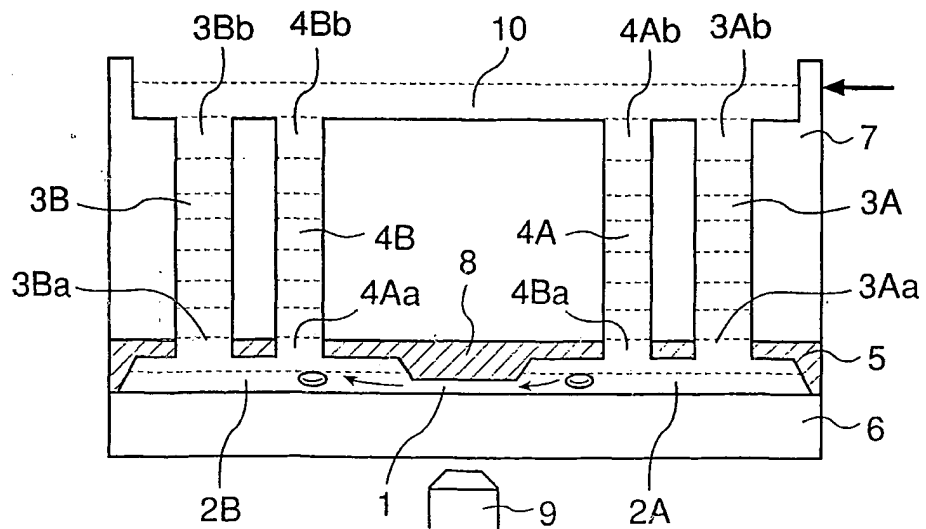
Fig.2



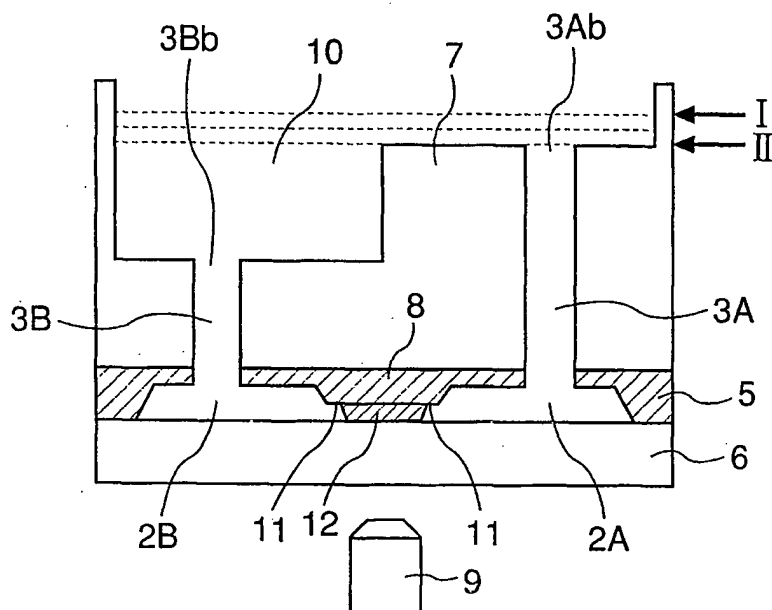
F i g .3



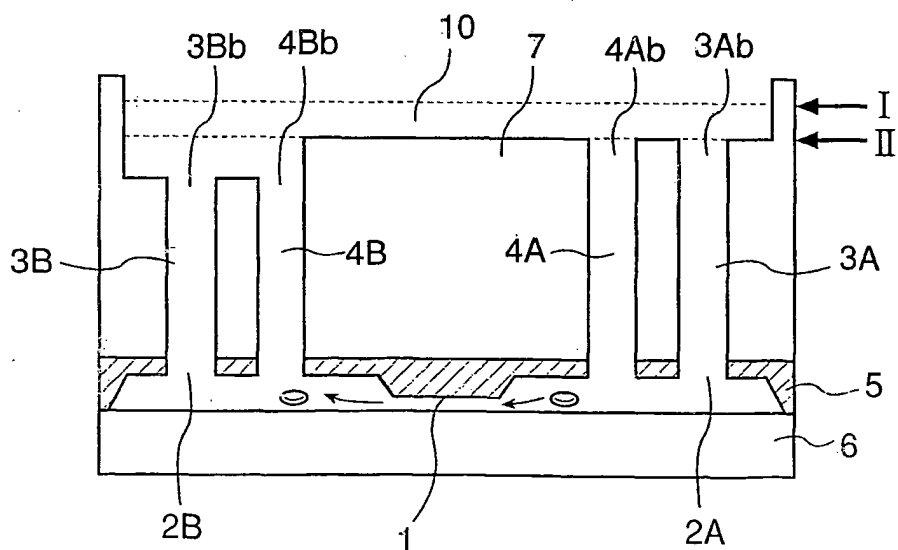
F i g .4



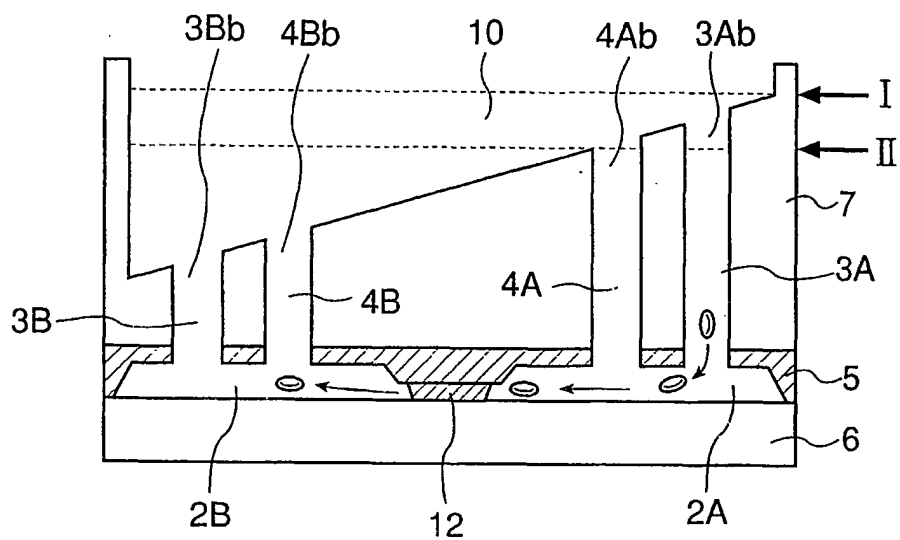
F i g .5



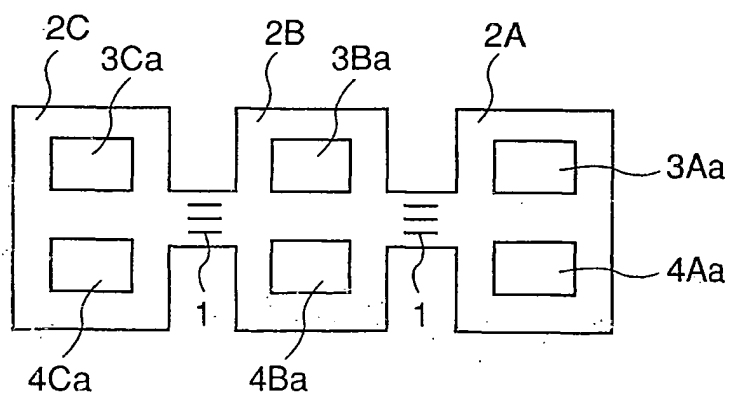
F i g .6



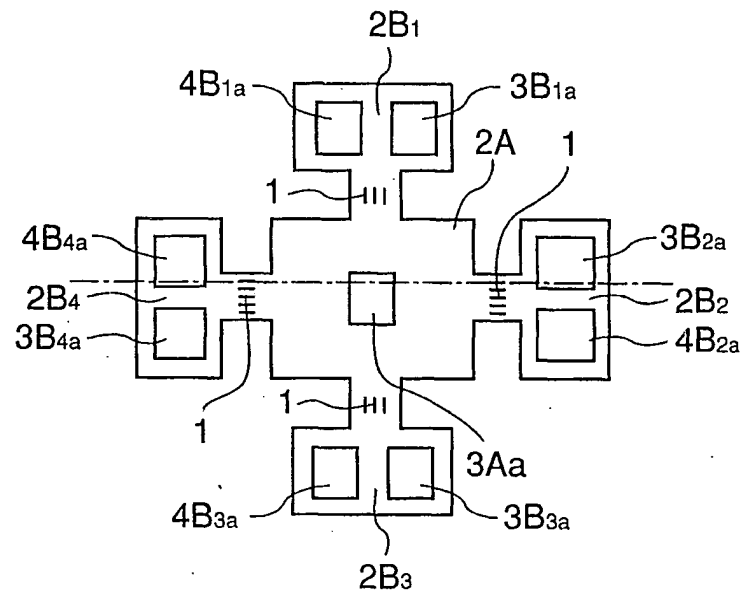
F i g . 7



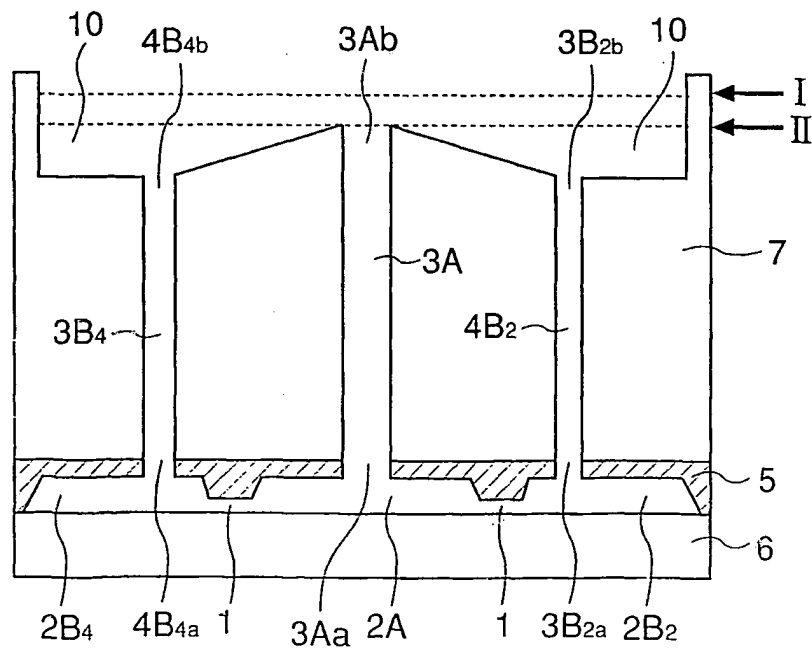
F i g . 8



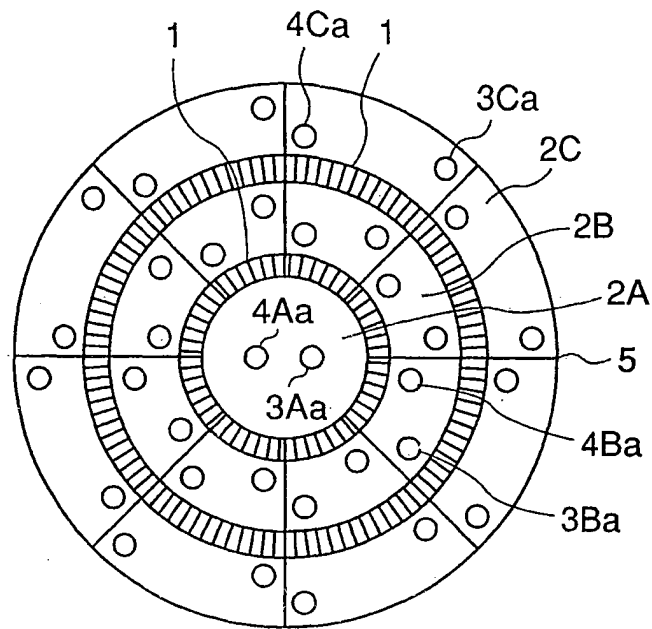
F i g .9



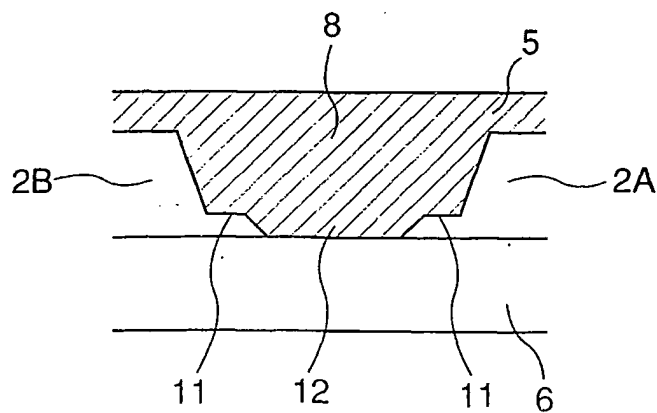
F i g .10



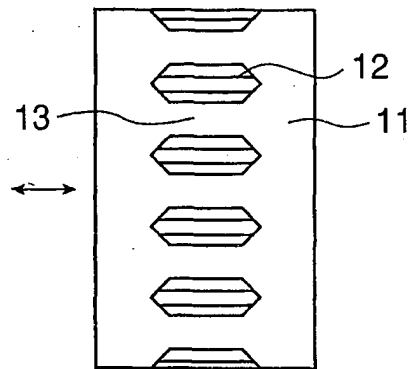
F i g.11



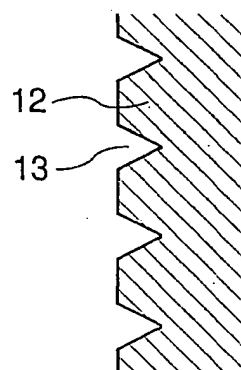
F i g.12



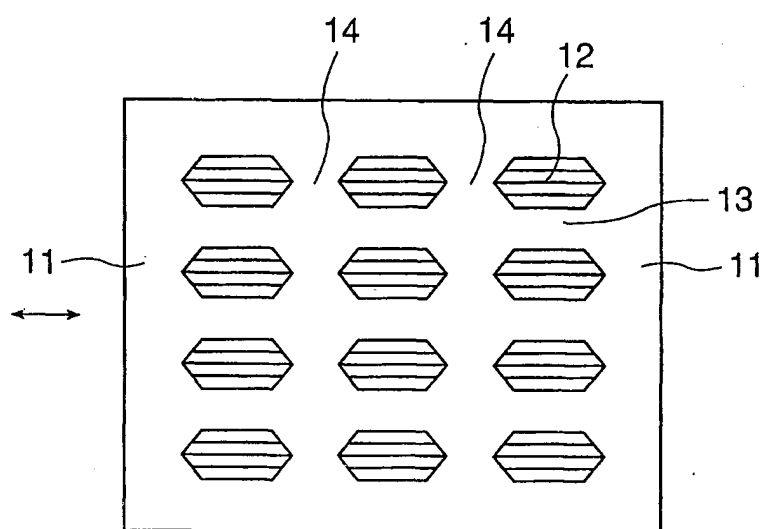
F i g .13



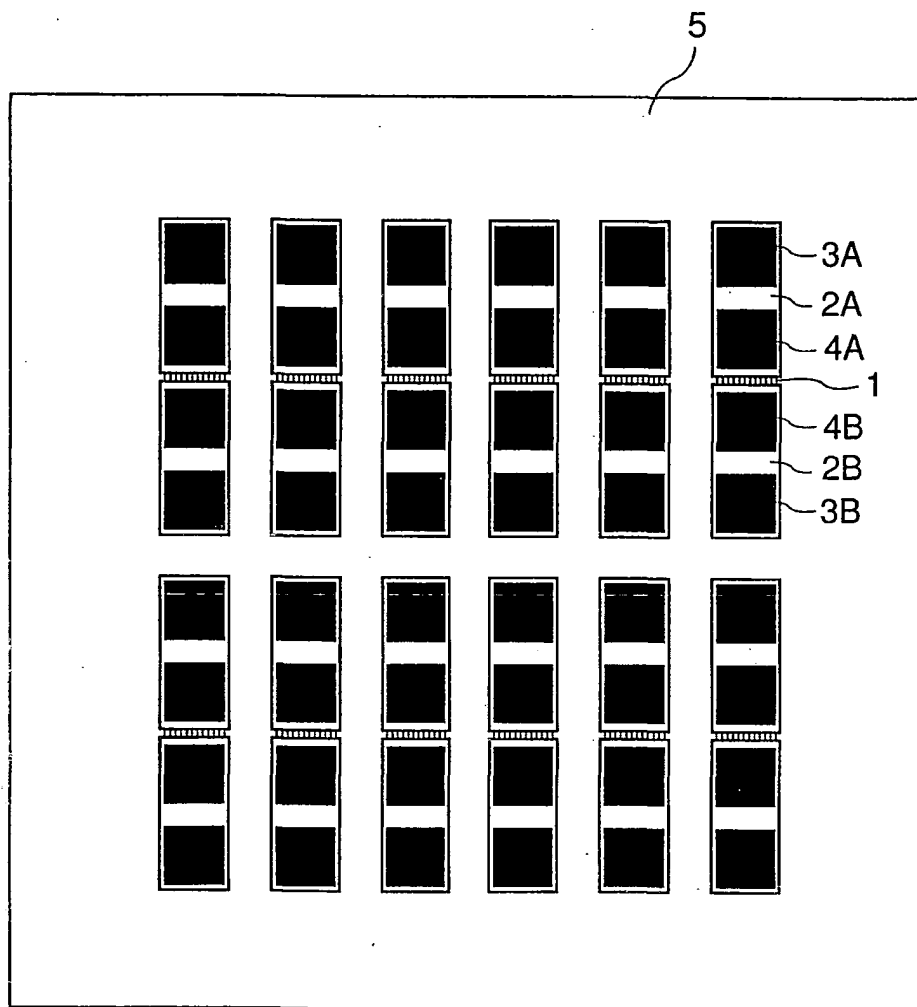
F i g .14



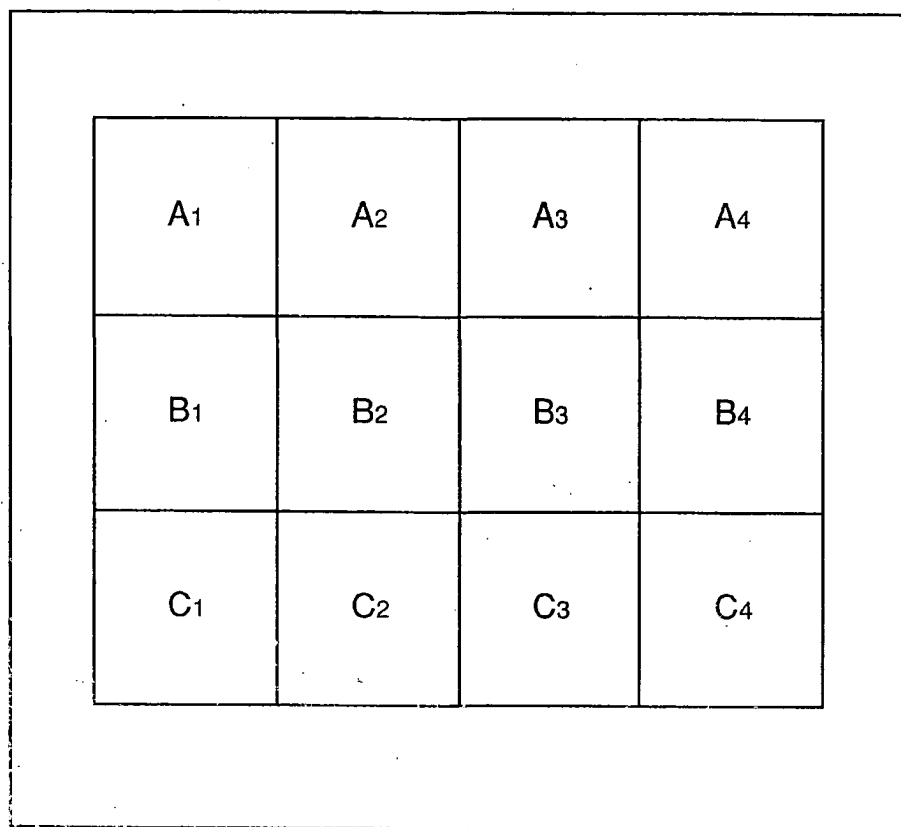
F i g .15



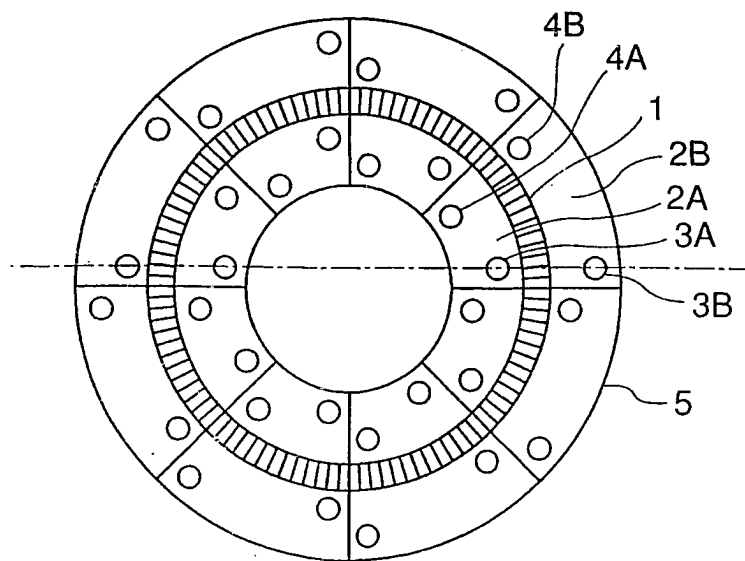
F i g.16



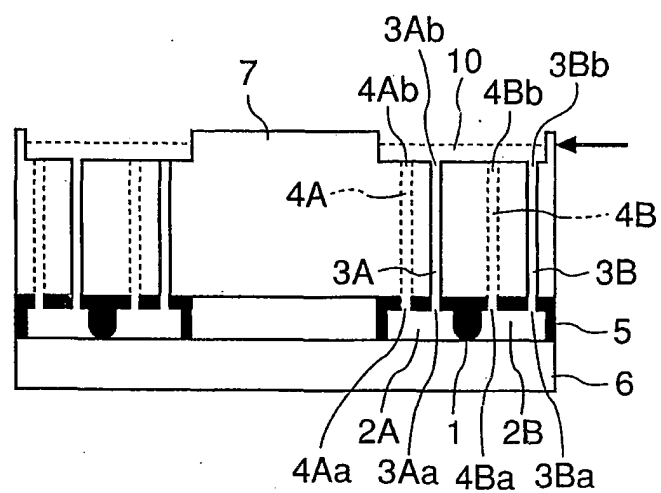
F i g .17



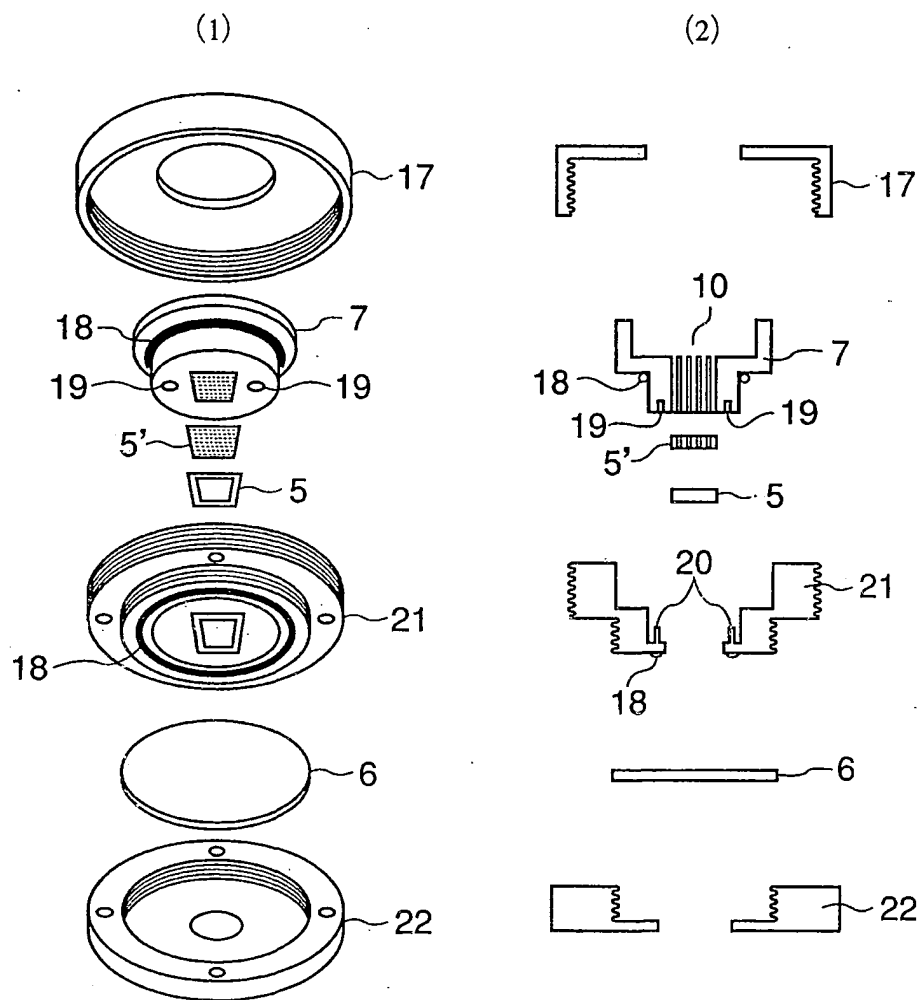
F i g .18



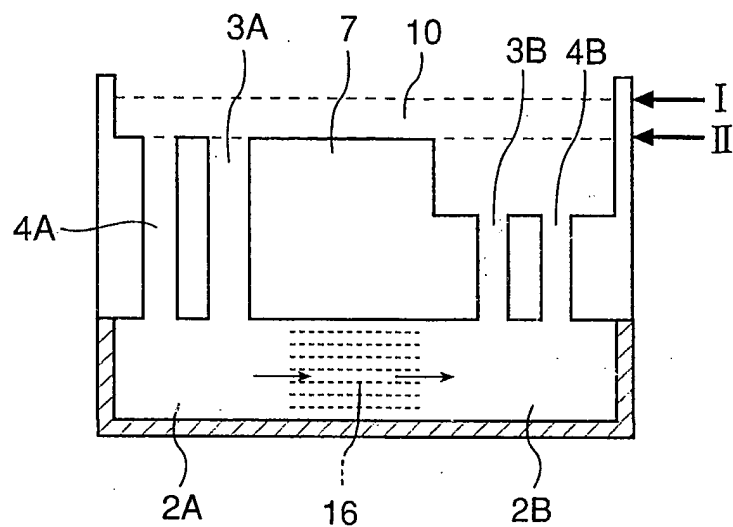
F i g .19



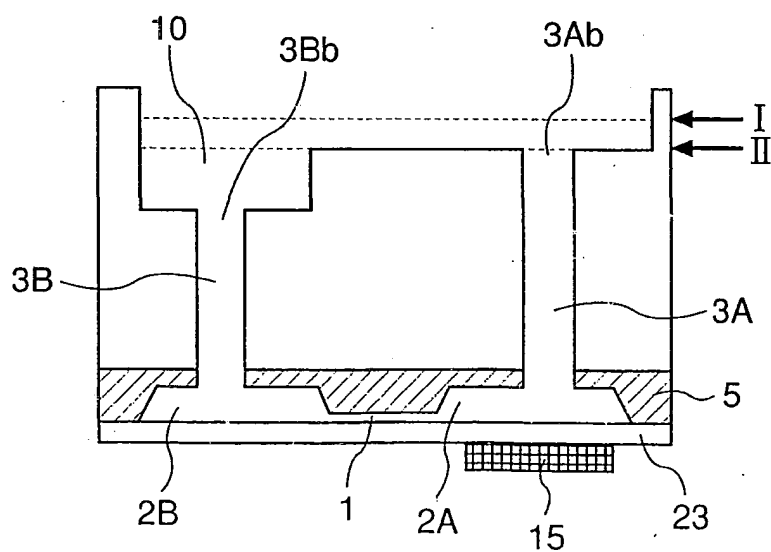
F i g .20



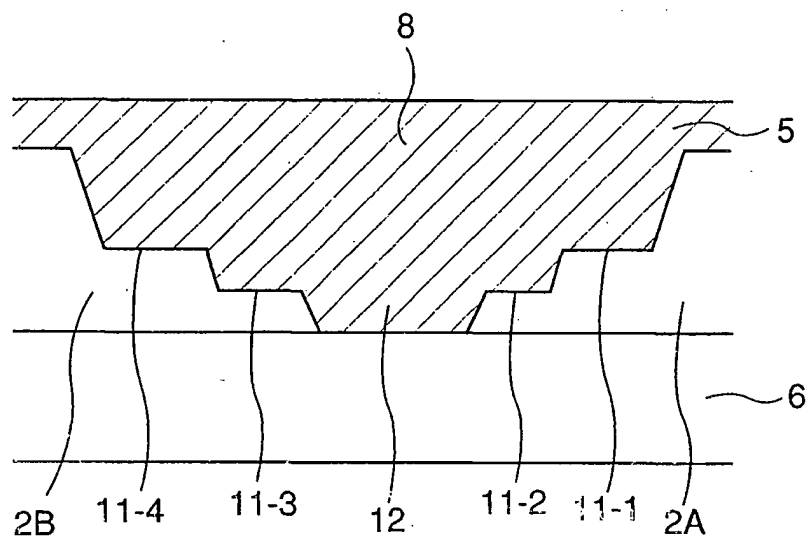
F i g .21



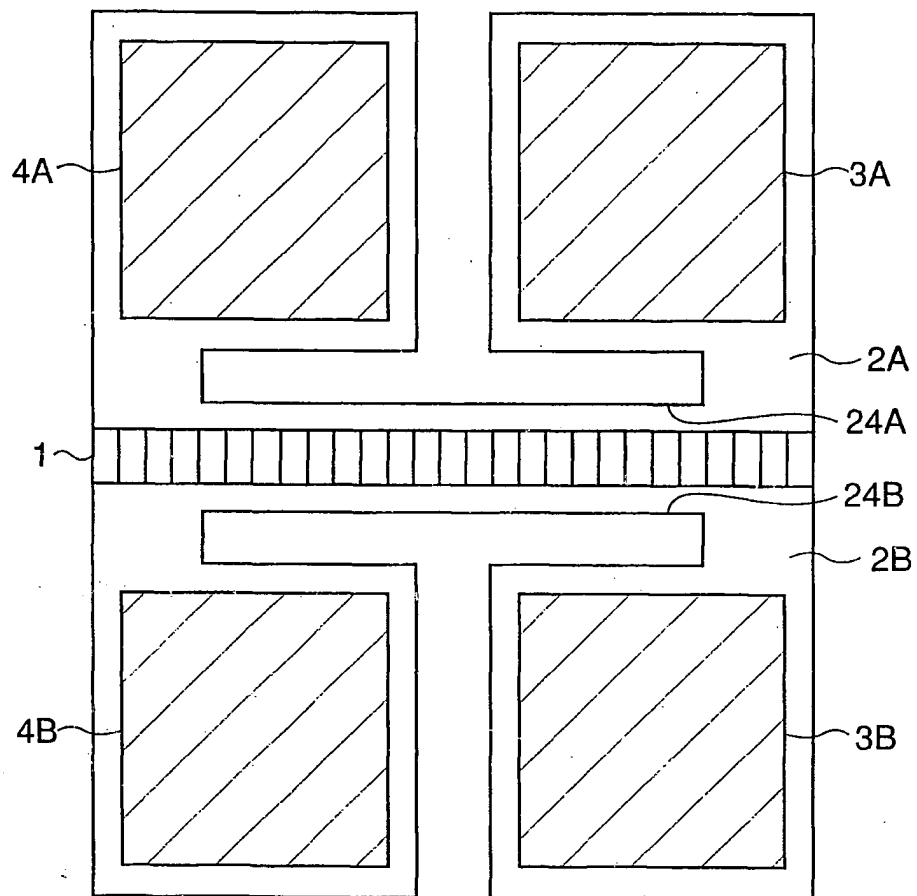
F i g .22



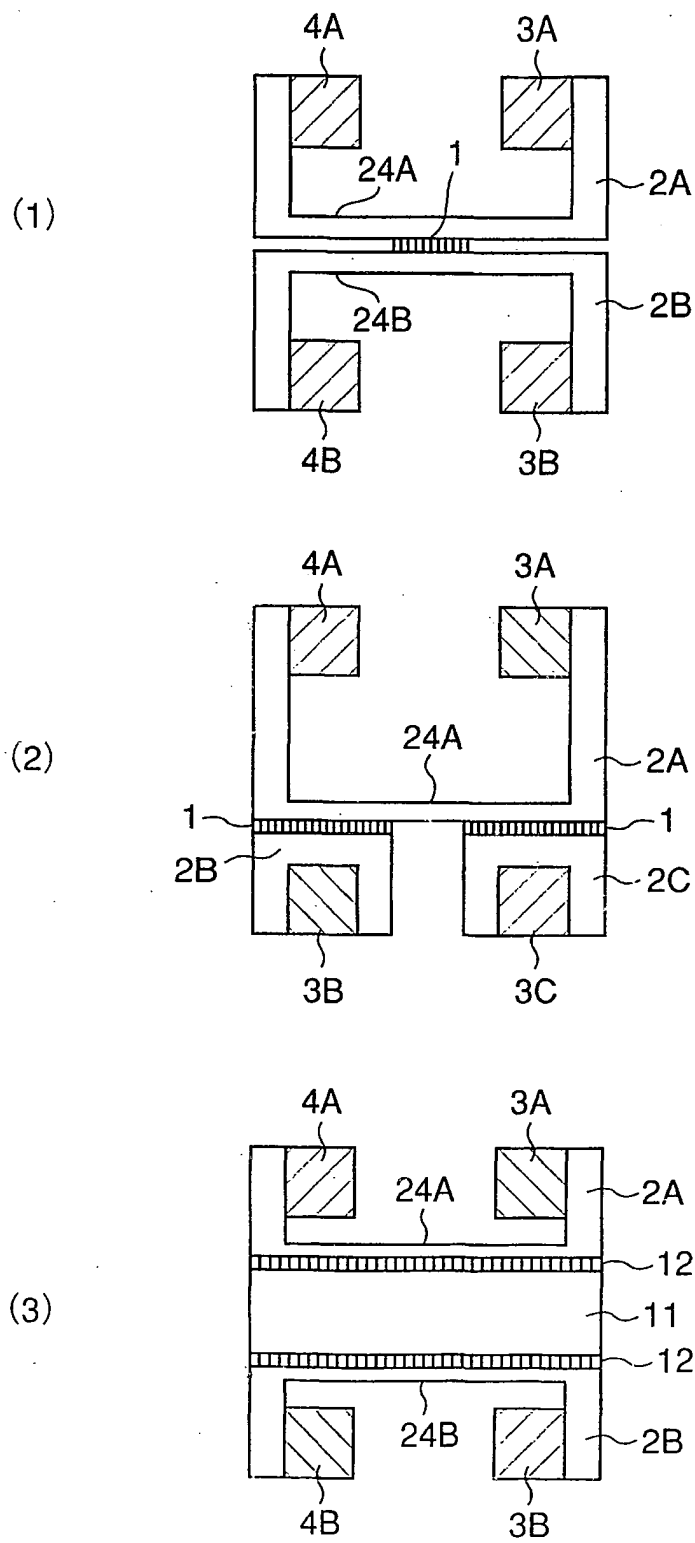
F i g .23



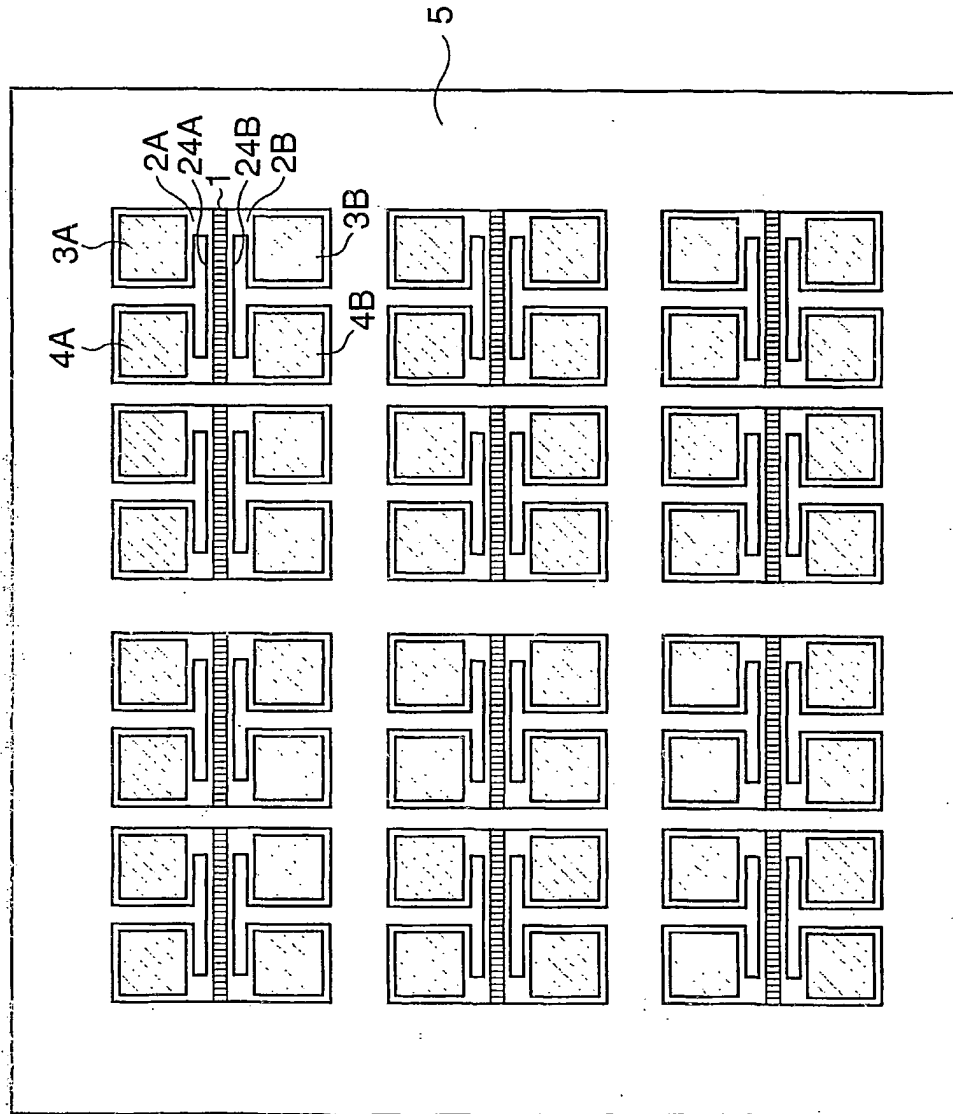
F i g .24



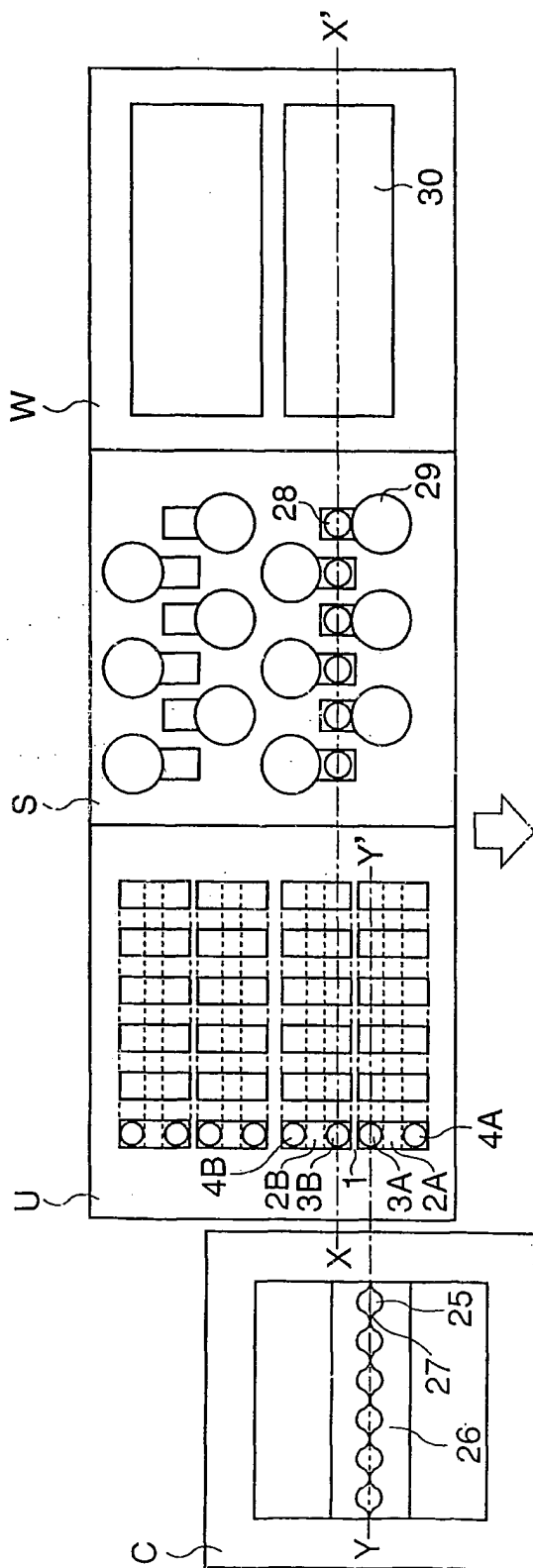
F i g .25



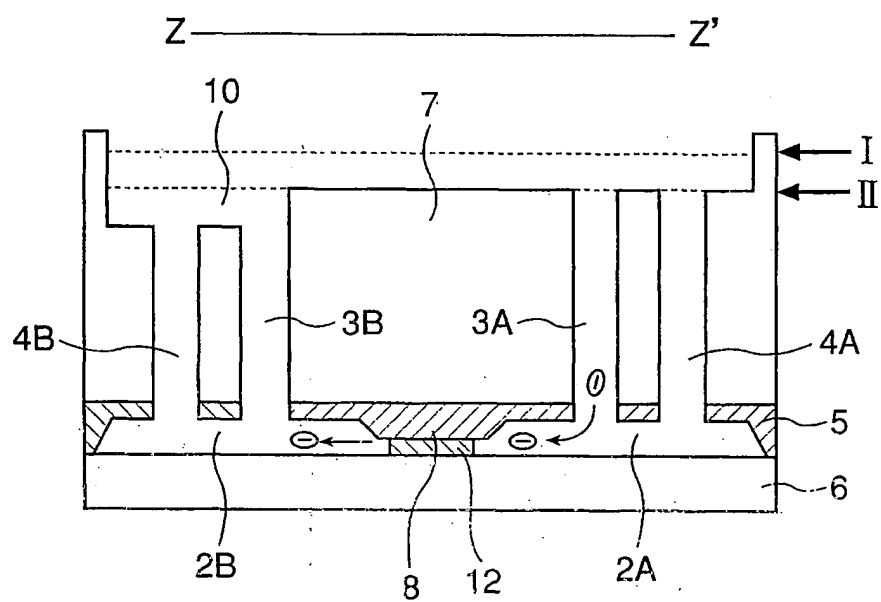
F i g .26



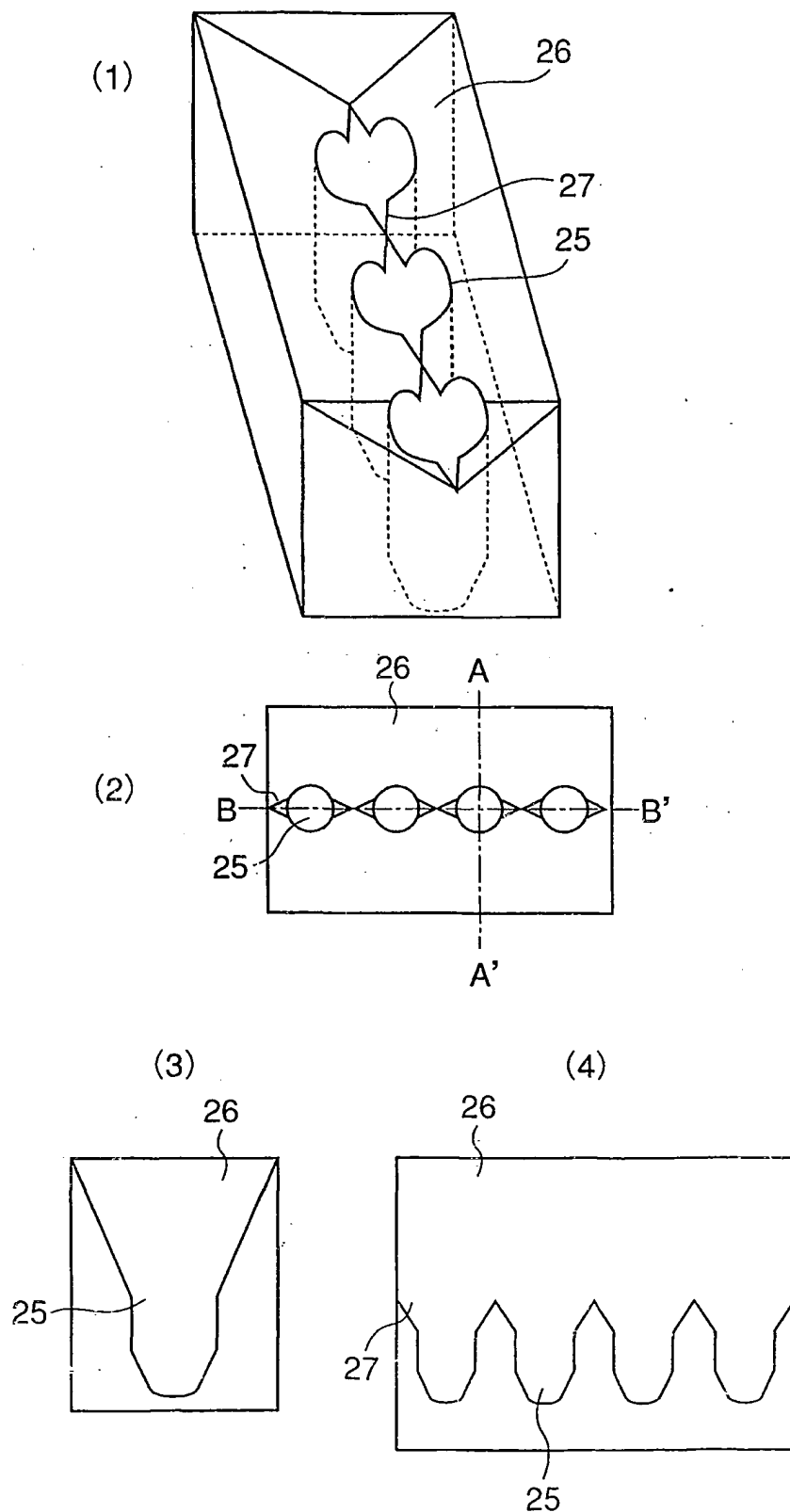
F i g .27



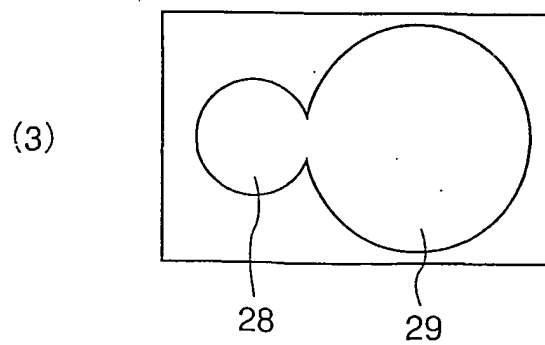
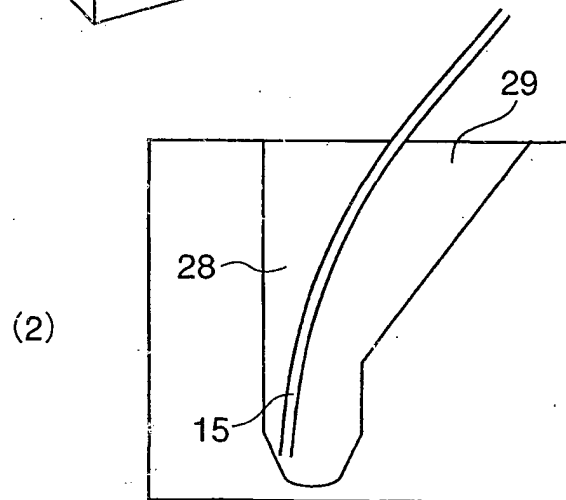
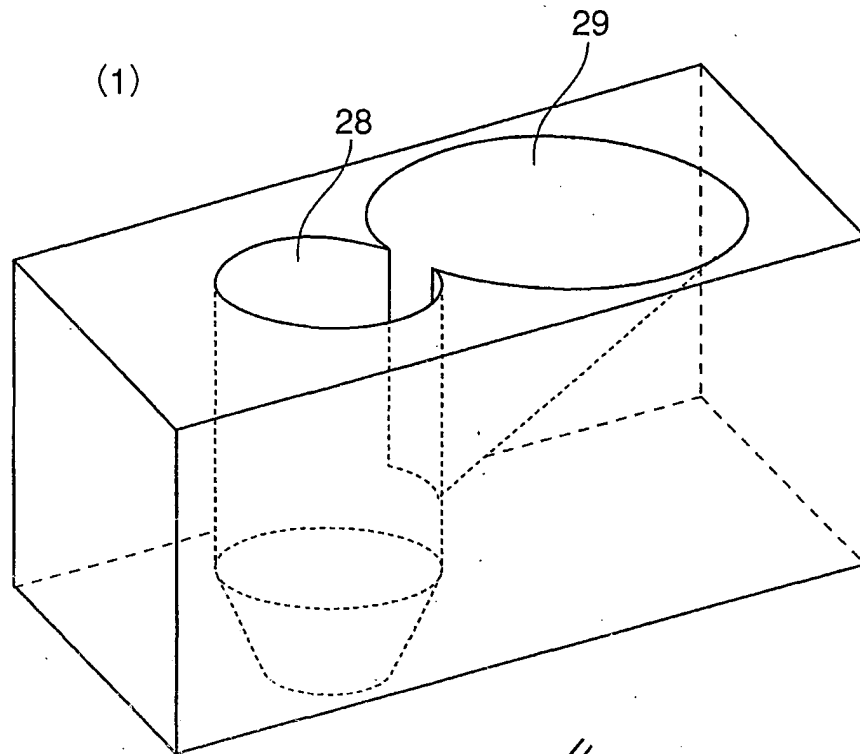
F i g .28



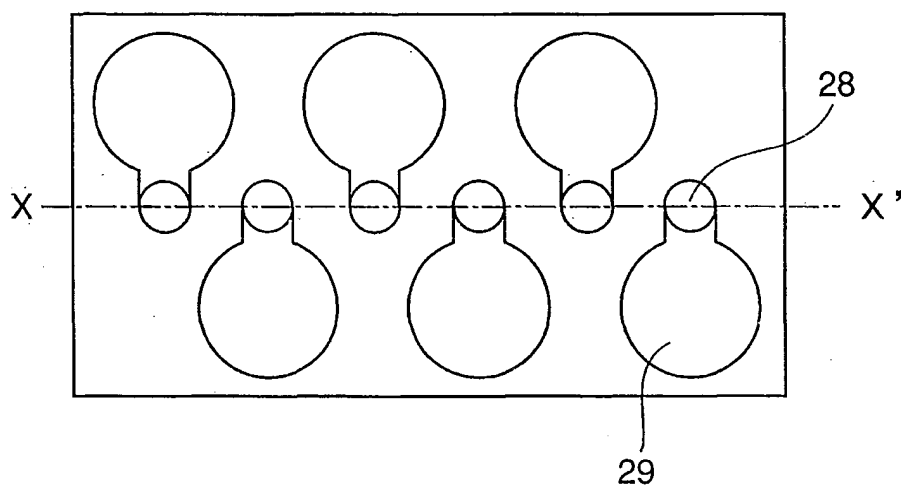
F i g .29



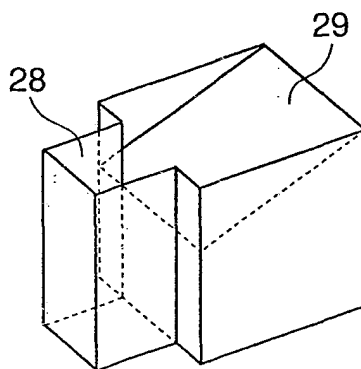
F i g .30



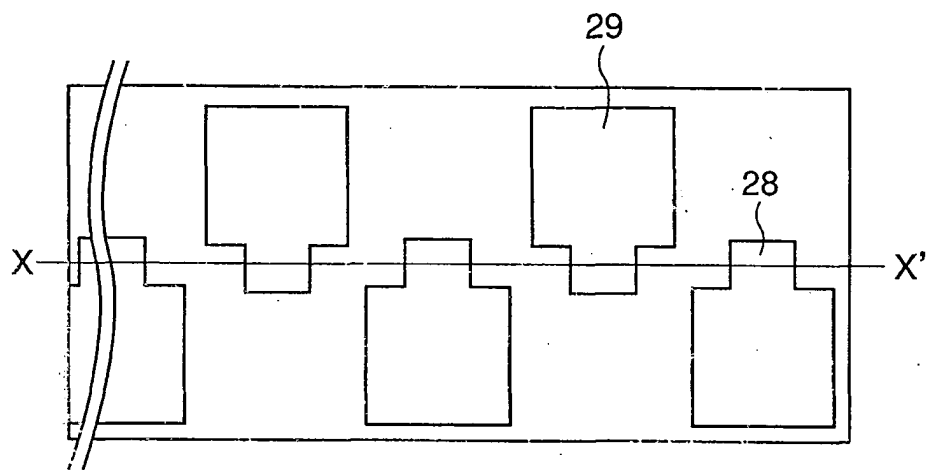
F i g .31



F i g .32

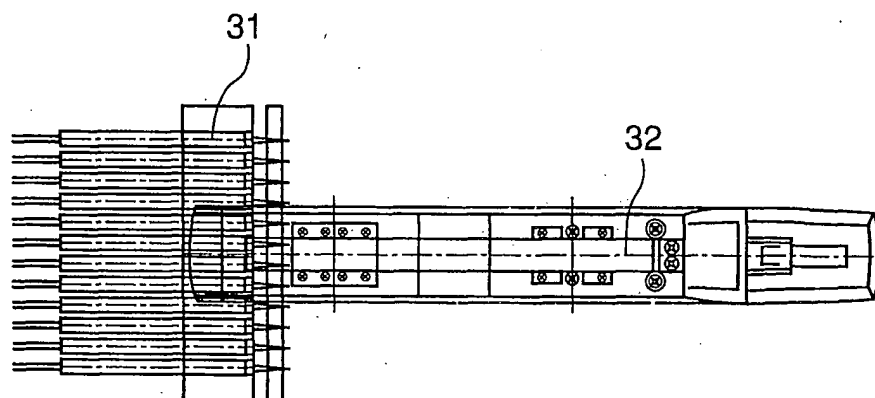


F i g .33

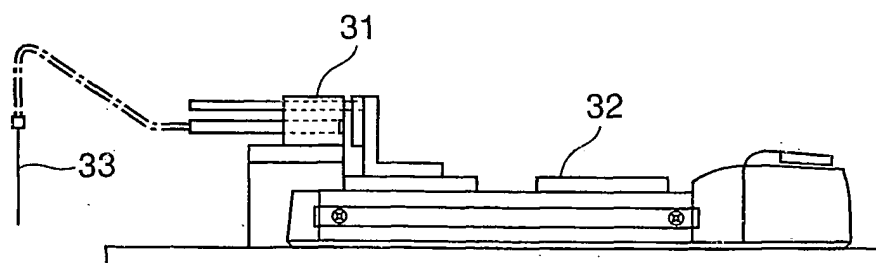


F i g .34

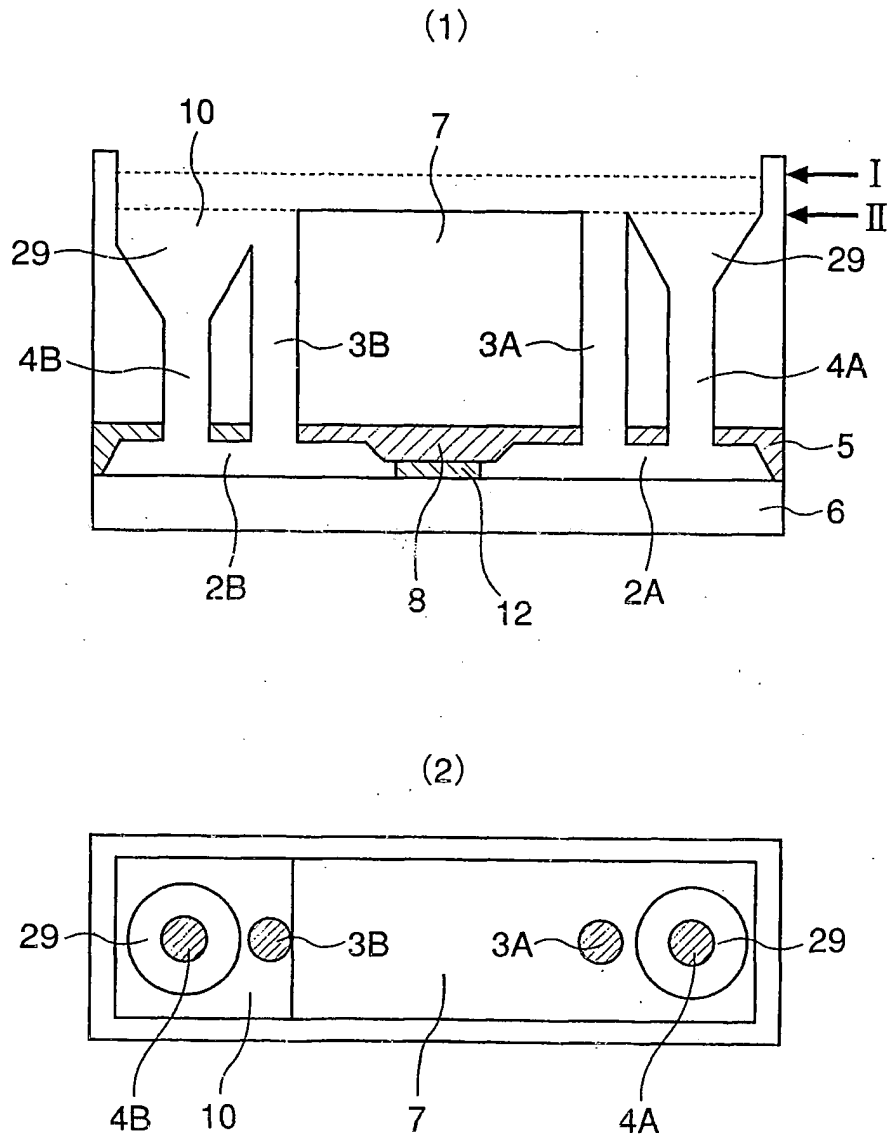
(1)



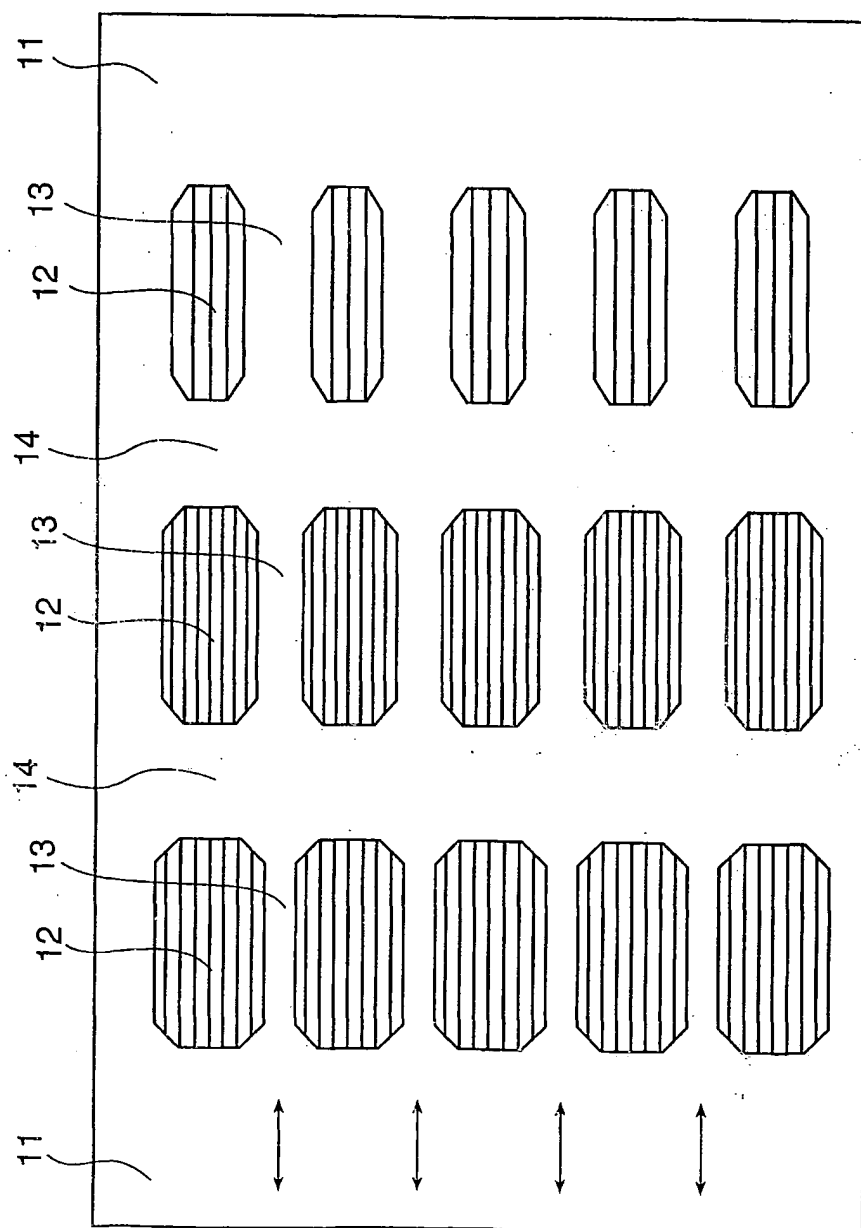
(2)



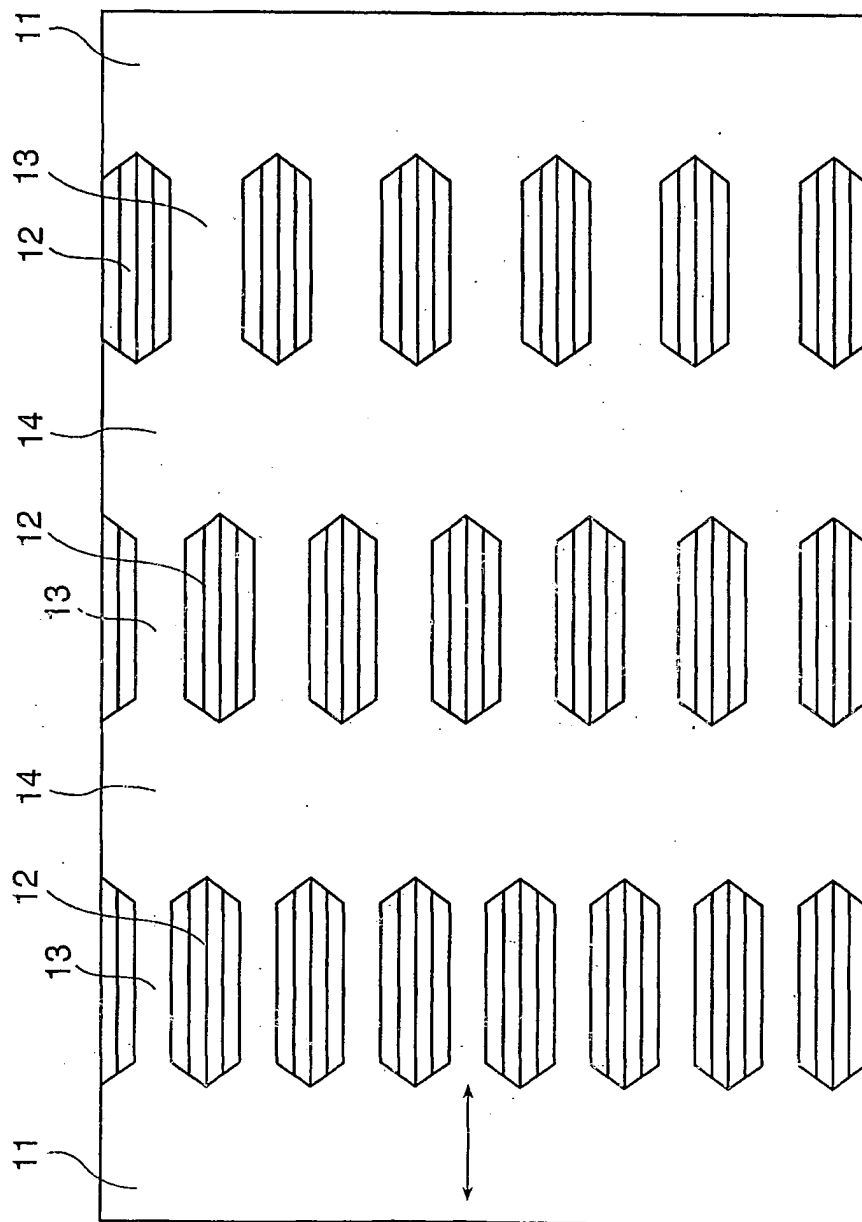
F i g .35



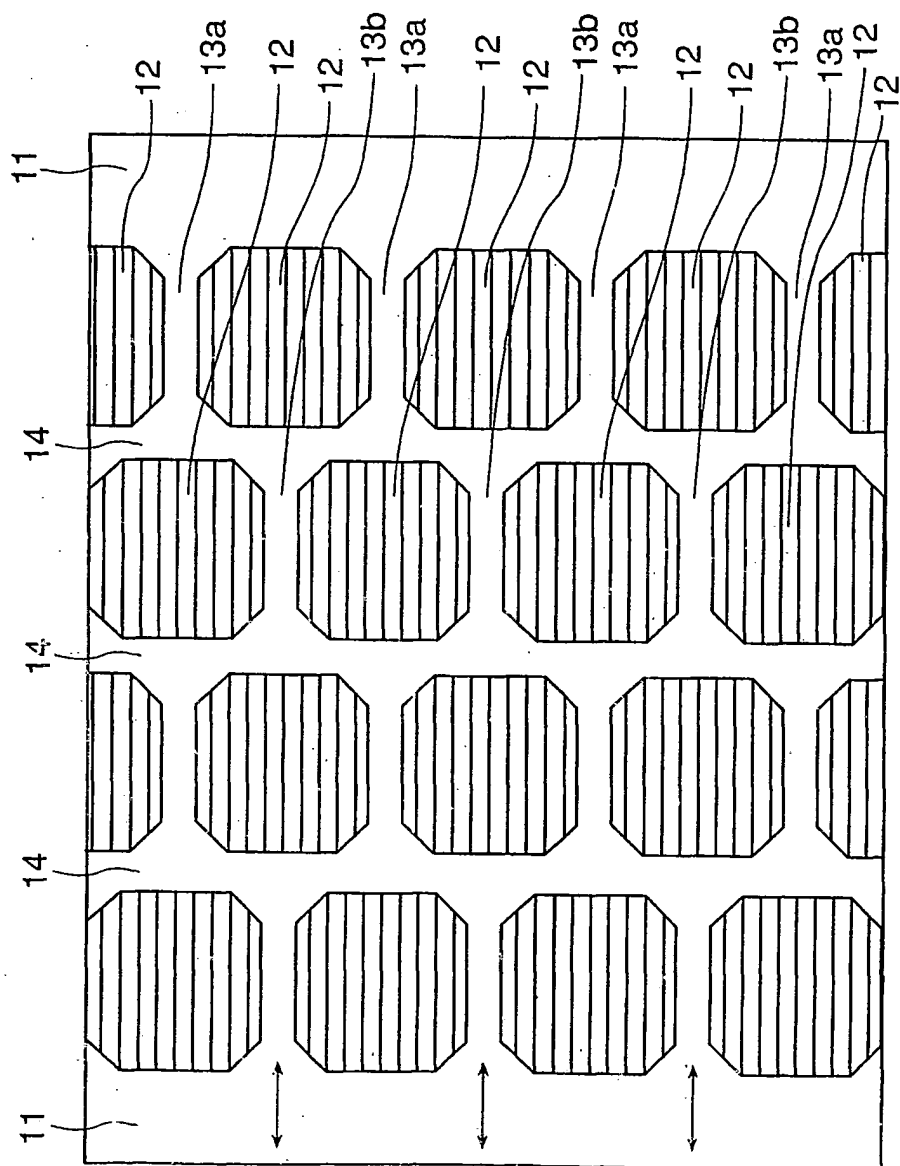
F i g .36



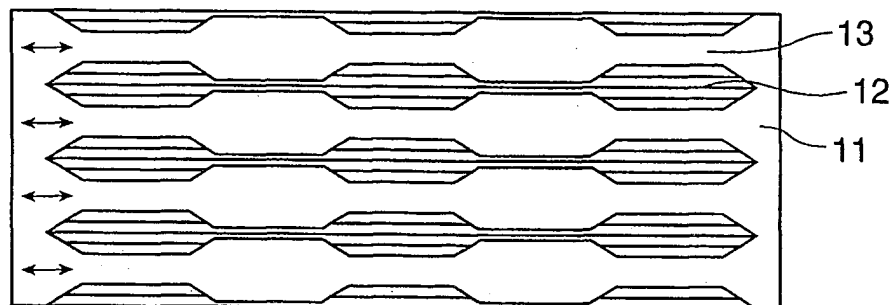
F i g .37



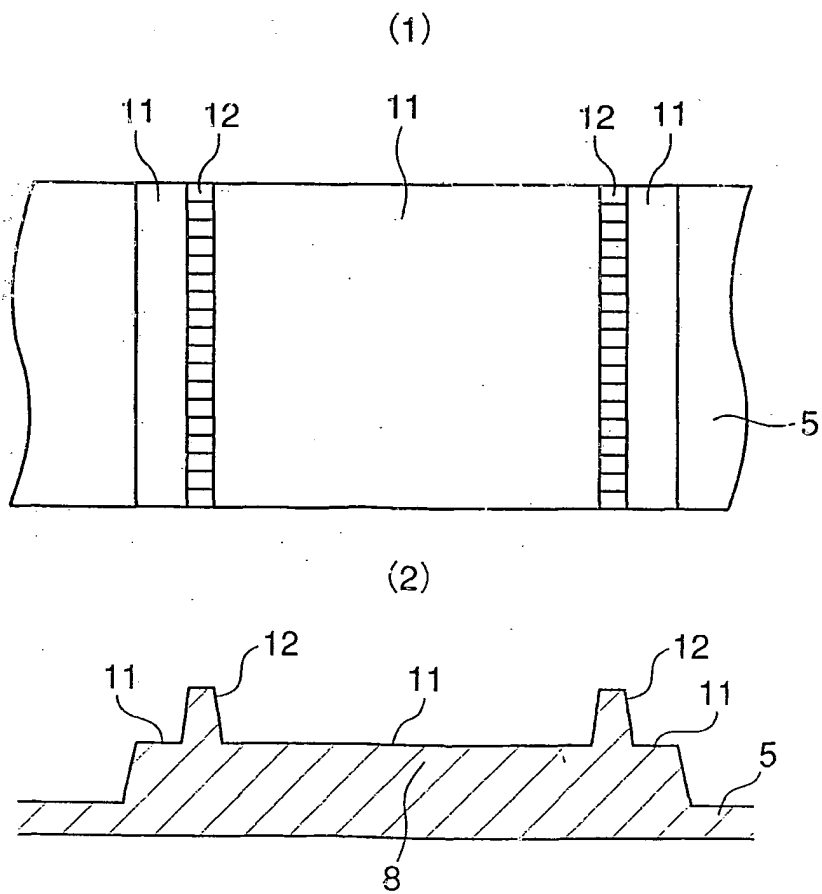
F i g .38



F i g .39



F i g .40



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10684

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12M1/32, 1/34, G01N33/48, 33/49, B01L3/00, B81B1/00, B81C5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12M1/00-1/42, G01N33/48-33/49

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A | JP, 8-23967, A (Hamamatsu Photonics K.K.), 30 January, 1996 (30.01.96), & JP 2685119 B2 | 1-23 |
| A | JP, 3-257366, A (Yuji KIKUCHI), 15 November, 1991 (15.11.91), & JP 2532707 B2 | 1+23 |
| A | JP, 11-165062, A (Director General of National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries), 22 June, 1999 (22.06.99), & JP 3089285 B2 | 1+23 |
| A | EP, 368241, A2 (Hitachi, Ltd.), 16 May, 1990 (16.05.90), & EP 368241 B1 & JP 2-130471 A & JP 2685544 B2 & US 5023054 A & DE 68918223 E | 1+23 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Special categories of cited documents: | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

Date of the actual completion of the international search
08 March, 2002 (08.03.02)Date of mailing of the international search report
19 March, 2002 (19.03.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10684

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A | WO, 94/16098, A1 (Neuro Probe, Inc.), 21 July, 1994 (21.07.94), & US 5284753 A & EP 679195 A1 & JP 8-505530 A | 1-23 |
| A | WO, 96/03206, A1 (E.I. Du Pont De Nemours And Co.), 08 February, 1996 (08.02.96), & US 5595712 A & EP 772490 A1 & EP 772490 B1 & JP 10-503708 A & BR 9508431 A & KR 97704510 A & DE 69505986 E & RU 2149054 C1 | 1-23 |
| A | JUNGER, W.G. et al., Improved rapid photometric assay for quantitative measurement of PMN migration, Journal of Immunological Methods, 15 March, 1993 (15.03.93), Vol.160, No.1, pages 73 to 79 | 1-23 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12M1/32, 1/34, G01N33/48, 33/49, B01L3/00,
B81B1/00, B81C5/00,

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12M1/00-1/42, G01N33/48-33/49

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|----------------------------------------------------------------|------------------|
| A | JP 8-23967 A (浜松ホトニクス株式会社) 1996. 01. 30 & JP 2685119 B2 | 1-23 |
| A | JP 3-257366 A (菊池佑二) 1991. 11. 15 & JP 2532707 B2 | 1-23 |
| A | JP 11-165062 A (農林水産省食品総合研究所長) 1999. 06. 22 & JP 3089285 B2 | 1-23 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08. 03. 02

国際調査報告の発送日

19.03.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田俊生

4B

8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| A | EP 368241 A2 (HITACHI, LTD.) 1990.05.16 & EP 368241 B1 & JP 2-130471 A & JP 2685544 B2 & US 5023054 A & DE 68918223 E | 1-23 |
| A | WO 94/16098 A1 (NEURO PROBE, INC.) 1994.07.21 & US 5284753 A & EP 679195 A1 & JP 8-505530 A | 1-23 |
| A | WO 96/03206 A1 (E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY) 1996.02.08 & US 5595712 A & EP 772490 A1 & EP 772490 B1 & JP 10-503708 A & BR 9508431 A & KR 97704510 A & DE 69505986 E & RU 2149054 C1 | 1-23 |
| A | JUNGER, W.G. et al., Improved rapid photometric assay for quantitative measurement of PMN migration, Journal of Immunological Methods, March 15, 1993, Volume 160, Number 1, pages 73-79 | 1-23 |